

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

Maíz genéticamente modificado MON-89Ø34-3 x DAS-Ø15Ø7 x MON-ØØ6Ø3-6 x SYN-IR162-4 (OCDE), aquí denominado MON89034xTC1507xNK603xMIR162, que contiene la acumulación de los eventos MON89034, TC1507, NK603 y MIR162. Los eventos confieren resistencia a los insectos Lepidópteros detallados en el presente documento (MON89034, TC1507 y MIR162) y tolerancia a los herbicidas glifosato (NK603) y glufosinato de amonio (TC1507), presentado por la empresa Dow AgroSciences Argentina S.A.

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 genéticamente modificado (GM) MON89034xTC1507xNK603xMIR162. 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 genéticamente modificado.

El maíz GM MON89034xTC1507xNK603xMIR162, que contiene la acumulación de los cuatro eventos de transformación individualmente denominados MON89034, TC1507, NK603 y MIR162; fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los parentales, conteniendo cada uno de los eventos de transformación en forma separada. El evento MON89034 obtuvo aprobación comercial en Argentina en el año 2010, el evento TC1507 en 2005, el evento NK603 en 2004, y el evento MIR162 en 2011. Asimismo, las acumulaciones intermedias TC1507xNK603 y MON89034xTC1507xNK603 también se encuentran autorizadas para su comercialización en nuestro país desde 2008 y 2012 respectivamente. Por su parte, la combinación intermedia TC1507xMIR162 fue autorizada en el año 2014 en el contexto de la aprobación comercial del evento Bt11xMIR162xTC1507xGA21.

El maíz GM MON89034xTC1507xNK603xMIR162 ha sido ensayado a campo en Argentina desde 2014. Para tal fin fueron evaluadas por la CONABIA DOS (2) 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 MON89034xTC1507xNK603xMIR162, a los eventos acumulados intermedios, y a toda la

progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales con cualquier maíz no GM obtenido en forma convencional.

I. CARACTERIZACIÓN DEL ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)

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

2. Denominación del evento: MON89034xTC1507xNK603xMIR162

3. Fenotipo aportado por las modificaciones genéticas introducidas:

El evento acumulado MON89034xTC1507xNK603xMIR162 confiere a la planta de maíz resistencia a los insectos Lepidópteros plagas principales *Diatraea saccharalis* y *Spodoptera frugiperda* y a otras plagas de menor relevancia en maíz como por ejemplo *Helicoverpa zea* y *Agrotis ipsilon*, mediante los productos de expresión de los genes *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry1F* y *vip3A20* aportados por los eventos MON89034, TC1507 y MIR162. Además, el mencionado evento acumulado confiere tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, otorgada por los productos de expresión de los genes *pat* (TC1057) y *cp4-epsps* (NK603) respectivamente.

3.1 Descripción del/los herbicidas:

El glufosinato de amonio (fosfinotricina) es un herbicida de amplio espectro y no residual, que actúa inhibiendo la enzima glutamino sintetasa al fijarse de manera competitiva en lugar de su sustrato habitual (el glutamato). Esto evita la síntesis de L-glutamina, que no sólo es un precursor químico importante para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, sino que además funciona como mecanismo para la incorporación de amoníaco (NH₃) en plantas.

Por su parte, el glifosato es un herbicida también de amplio espectro y no residual que inhibe, en este caso, a la enzima cloroplástica 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Dicha enzima se encuentra involucrada en la ruta bioquímica del corismato y los compuestos derivados (aminoácidos aromáticos, entre otros).

3.2 Especies blanco más relevantes y características de las mismas:

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 mayor supervivencia de las larvas invernantes por la siembra directa, ha incrementado el potencial de daño de este insecto. Se ha determinado que en algunos rastros de maíz las larvas invernantes de *D. saccharalis* pueden alcanzar densidades de 30 a 40.000 larvas / Ha., 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. 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.

El uso de MON89034xTC1507xNK603xMIR162 como parte de un plan integral de manejo de resistencia a insectos (IRM) es una estrategia a largo plazo para controlar la presión ejercida por los insectos plagas mencionados anteriormente, permitiendo evitar mermas en el rendimiento del cultivo de maíz.

3.3. Mecanismo de acción de los productos de expresión:

a- Proteínas insecticidas:

Las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 (MON89034), Cry1F (TC1507) y Vip3Aa20 (MIR162), 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, mientras que las proteínas Vip son producidas durante la etapa vegetativa de crecimiento (además de la etapa de esporulación) de la bacteria.

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 demostró previamente, en instancias de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales, que el espectro de actividad de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F y Vip3Aa20 se encuentra acotado al Orden Lepidoptera, sumando de esta manera diferentes modos de acción para las mismas especies blanco.

b- Proteínas de tolerancia a herbicidas:

La proteína fosfinotricina acetil transferasa (PAT) acetila específicamente al glufosinato de amonio en su extremo N-terminal inactivando así al herbicida. De esta manera, la tolerancia es conferida por la modificación del herbicida, permitiendo a la planta continuar con los procesos biológicos habituales. Es importante señalar que la enzima PAT no presenta actividad con el glutamato, que tiene una estructura similar al herbicida, ni con cualquiera de los demás aminoácidos.

Por su parte, la proteína CP4 EPSPS, es equivalente funcionalmente a la enzima EPSPS endógena de maíz pero, a diferencia de ésta, posee mayor afinidad por su sustrato (fosfoenolpiruvato) que por el herbicida, permitiendo que la síntesis de aminoácidos aromáticos continúe del mismo modo en que lo haría en ausencia del glifosato, siendo ésta la base para la tolerancia al herbicida.

Cabe señalar que, los mecanismos de acción de cada una de las proteínas presentes en el evento acumulado responsables de conferir los fenotipos declarados, fueron evaluados en detalle en instancias de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales, resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos. No existen razones para suponer que estas características hayan cambiado en el maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162.

4. Modificaciones genéticas introducidas.

4.1 Método de obtención:

El maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 es el resultado del cruzamiento convencional de variedades de maíz conteniendo los eventos individuales MON89034, TC1507, NK603 y MIR162.

Por su parte, los eventos parentales TC1507 y NK603 han sido obtenidos mediante transformación por aceleración de micropartículas, mientras que los eventos MON89034 y MIR 162 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 oportunamente en instancias de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales MON89034, TC1507, NK603 y MIR162, resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos.

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

En cada uno de los eventos individuales, los genes y secuencias regulatorias insertadas se encuentran formando parte de un solo inserto en un único locus cromosómico. La integridad de cada uno de los insertos ha sido verificada experimentalmente y evaluada oportunamente en instancias de las solicitudes de liberación comercial de los eventos individuales.

Los resultados del análisis de las secuencias a través de *Southern blot* demuestran que, durante la obtención del maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 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:

Los estudios realizados en los sitios de integración de cada uno de los eventos parentales, con el fin de determinar posibles rearrreglos en el genoma vegetal (deleciones, interrupciones de genes, generación de nuevos marcos de lectura abierto, nuevos péptidos putativos, etc), fueron evaluados oportunamente en instancias de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos. Dado que el maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 se obtuvo por cruzamiento convencional, no existen razones para suponer que estas características hayan cambiado en dicho evento.

5. Detección:

La presencia de cada uno de los eventos parentales puede ser determinada experimentalmente mediante técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el evento acumulado, 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. Estabilidad genética y fenotípica:

Cada uno de los eventos individuales que conforman el maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162, se transfieren a la progenie segregando independientemente unos de otros, siguiendo un patrón mendeliano simple.

Las estabildades genéticas y fenotípicas fueron evaluadas en instancia de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales MON89034, TC1507, NK603 y MIR162 resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos.

Dado que MON89034xTC1507xNK603xMIR162 fue obtenido por cruzamiento convencional de los eventos parentales, no se esperan cambios en relación a las estabildades mencionadas.

2. Productos de expresión de las secuencias introducidas:

Durante la campaña 2014-2015 se realizaron ensayos a campo en 6 localidades de Argentina con el objetivo de evaluar, mediante la técnica de ELISA, los niveles de expresión que presentan las proteínas introducidas en el evento acumulado, en comparación con los eventos parentales. (Ver Tablas 1 a 7)

Para tal fin, se analizaron tejidos de hoja (V2-V4, V9 y R1), raíz (R1), polen (R1), forraje (R4) y grano (R6). El estudio se realizó sobre plantas portadoras del evento acumulado y plantas con los eventos parentales que correspondan según la proteína analizada. Al mismo tiempo, se utilizó la línea isogénica como control negativo. Los niveles de expresión del evento acumulado fueron analizados tanto con la aplicación combinada de ambos herbicidas (tratado) como sin la aplicación de los mismos (no tratado).

Tabla 1: Niveles de expresión de la proteína Cry1A.105 (ng/mg, peso seco - dwt).

Tejido	Entrada	Descripción	Cry1A.105 ng/mg dw t		
			Promedio	Desvío estándar (n=10)	Min/Max
Hoja V2-V4	1	Control	1.03	3.51	ND-16.39
	5	PW x MIR no tratado	645.36	281.29	329.57-1317.18
	6	PW x MIR tratado	850.32	295.56	278.04-1482.76
	9	MON-89034-3	895.61	411.91	123.48-2270.75
Hoja V9	1	Control	0.63	3.07	ND-15.02
	5	PW x MIR no tratado	506.1	244.58	ND-978.18
	6	PW x MIR tratado	735.22	290.23	182.20-1390.11
	9	MON-89034-3	647.54	280.83	114.84-1174.18
Hoja R1	1	Control	2.49	12.21	ND-59.82
	5	PW x MIR no tratado	417.08	309.65	63.13-923.73
	6	PW x MIR tratado	384.39	230.37	67.72-906.02
	9	MON-89034-3	371.70	298.19	57.80-1308.76
Raíz R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	79.48	27.68	48.29-138.34
	6	PW x MIR tratado	83.45	31.77	36.71-145.48
	9	MON-89034-3	76.09	29.66	32.97-128.37
Polen R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	89.32	19.51	57.42-124.18
	6	PW x MIR tratado	96.92	23.84	54.96-136.91
	9	MON-89034-3	57.71	21.68	24.97-104.29
Forraje R4	1	Control	0.04	0.18	ND-0.87
	5	PW x MIR no tratado	53.41	22.04	10.81-129.32
	6	PW x MIR tratado	63.64	30.6	22.21-128.20
	9	MON-89034-3	53.12	14.17	19.88-79.13
Grano R6	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	23.06	8.08	12.57-45.3
	6	PW x MIR tratado	22.64	6.99	10.03-39.73
	9	MON-89034-3	14.12	6.41	5.08-33.11

MIR: SYN-IR162-4

PW: MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6

NA: No Disponible

ND: No Detectable

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

Tabla 2: Niveles de expresión de la proteína Cry2Ab2 (ng/mg, peso seco).

Tejido	Entrada	Descripción	Cry2Ab2 ng/mg dwt		
			Promedio	Desvío estándar (n=10)	Min/Max
Hoja V2-V4	1	Control	0.77	2.7	ND-11.79
	5	PW x MIR no tratado	258.88	100.78	149.3-507.96
	6	PW x MIR tratado	274.61	127.45	77.4-617.48
	9	MON-89034-3	263.13	85.38	152.47-487.16
Hoja V9	1	Control	0.35	1.72	ND-8.41
	5	PW x MIR no tratado	150.94	59.24	0.09-251.76
	6	PW x MIR tratado	173.96	28.14	131.43-227.53
	9	MON-89034-3	182.94	32.83	133.24-255.54
Hoja R1	1	Control	0.48	2.35	ND-11.52
	5	PW x MIR no tratado	189.1	27.41	148.79-270.67
	6	PW x MIR tratado	182.42	26.28	118.63-225.19
	9	MON-89034-3	195.36	35.72	108.21-248.12
Raíz R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	31.83	25.03	7.74-78.9
	6	PW x MIR tratado	30.93	21.97	10.49-74.22
	9	MON-89034-3	33.03	25.9	10.93-89.77
Polen R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	2.16	0.83	1.25-3.87
	6	PW x MIR tratado	2.26	0.78	1.28-3.55
	9	MON-89034-3	1.07	0.16	0.81-1.4
Forraje R4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	32.52	9.77	16.45-48.92
	6	PW x MIR tratado	31.13	6.91	18.77-42.77
	9	MON-89034-3	39.76	17.42	25.27-112.94
Grano R6	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	4.86	1.09	3.31-7.84
	6	PW x MIR tratado	5.37	1.19	3.51-8.04
	9	MON-89034-3	5.45	1.55	2.82-8.59

MIR: SYN-IR162-4
PW: MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6
NA: No Disponible
ND: No Detectable

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

Tabla 3: Niveles de expresión de la proteína Cry1F (ng/mg, peso seco).

Tejido	Entrada	Descripción	Cry1F ng/mg dwt		
			Promedio	Desvío estándar (n=10)	Min/Max
Hoja V2-V4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	34.28	9.13	20.52-50.87
	6	PW x MIR tratado	34.67	14.48	7.38-66.43
	10	DAS-01507-1	36.01	15.40	7.66-67.97
Hoja V9	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	14.61	6.43	ND-25.52
	6	PW x MIR tratado	19.33	6.6	8.82-29.26
	10	DAS-01507-1	20.26	7.84	7.93-33.89
Hoja R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	16.33	3.31	10.44-22.97
	6	PW x MIR tratado	16.47	5.34	3.39-26.48
	10	DAS-01507-1	15.73	4.9	6.51-23.17
Raíz R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	2.68	1.72	0.89-6.24
	6	PW x MIR tratado	2.55	1.58	0.89-5.88
	10	DAS-01507-1	2.17	1.37	0.81-5.33
Polen R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	37.70	6.05	28.20-54.41
	6	PW x MIR tratado	40.36	7.14	21.7-50.28
	10	DAS-01507-1	35.92	7.69	25.34-58.10
Forraje R4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	4.79	1.61	2.27-7.66
	6	PW x MIR tratado	5.32	1.71	2.13-9.99
	10	DAS-01507-1	5.4	2.55	2.8-12.82
Grano R6	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	3.75	0.73	2.4-5.19
	6	PW x MIR tratado	3.61	0.85	2.36-6.85
	10	DAS-01507-1	3.59	0.74	2.36-5.28

MIR: SYN-IR162-4

PW: MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6

NA: No Disponible

ND: No Detectable

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

Tabla 4: Niveles de expresión de la proteína PAT (ng/mg).

Tejido	Entrada	Descripción	PAT ng/mg		
			Promedio	Desvío estándar (n=10)	Min/Max
Hoja V2-V4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	3.5	1.64	1.69-9.11
	6	PW x MIR tratado	3.64	2.0	1.84-9.56
	10	DAS-01507-1	4.19	2.15	1.27-10.34
Hoja V9	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	3.61	1.19	ND-5.84
	6	PW x MIR tratado	4.0	1.2	2.59-6.76
	10	DAS-01507-1	5.13	2.01	1.61-11.5
Hoja R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	3.59	1.61	1.78-10.55
	6	PW x MIR tratado	3.93	1.2	2.17-6.99
	10	DAS-01507-1	3.82	1.16	0.82-7.09
Raíz R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	0.09	0.1	ND-0.42
	6	PW x MIR tratado	0.07	0.05	ND-0.23
	10	DAS-01507-1	0.08	0.06	ND-0.3
Polen R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	NA	NA	ND-ND
	6	PW x MIR tratado	NA	NA	ND-ND
	10	DAS-01507-1	NA	NA	ND-ND
Forraje R4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	0.07	0.07	ND-0.29
	6	PW x MIR tratado	0.07	0.06	ND-0.25
	10	DAS-01507-1	0.07	0.08	ND-0.36
Grano R6	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	NA	NA	ND-ND
	6	PW x MIR tratado	0	NA	ND-0.03
	10	DAS-01507-1	NA	NA	ND-ND

MIR: SYN-IR162-4

PW: MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6

NA: No Disponible

ND: No Detectable

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

Tabla 5: Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa20 (ng/mg)

Tejido	Entrada	Descripción	Vip3Aa20 ng/mg		
			Promedio	Desvío estándar (n=10)	Min/Max
Hoja V2-V4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	206.84	59.89	124.44-290.18
	6	PW x MIR tratado	228.72	93.07	90.07-387.04
	8	SYN-IR162-4	237.24	59.1	127.42-359.75
Hoja V9	1	Control	4.06	19.91	ND-97.55
	5	PW x MIR no tratado	64.24	24.37	ND-109.78
	6	PW x MIR tratado	67.27	21.33	34.7-104.07
	8	SYN-IR162-4	76.02	26.15	19.31-125.89
Hoja R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	122.48	35.19	59.7-184.41
	6	PW x MIR tratado	122.22	29.05	59.85-173.0
	8	SYN-IR162-4	120.68	31.82	57.53-182.24
Raíz R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	25.01	13.50	7.28-48.92
	6	PW x MIR tratado	27.59	17.66	7.99-65.91
	8	SYN-IR162-4	23.5	18.72	1.55-64.56
Polen R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	34.11	3.67	26.03-41.71
	6	PW x MIR tratado	47.32	9.44	32.71-67.7
	8	SYN-IR162-4	30.92	8.78	12.3-44.94
Forraje R4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	50.53	21.62	9.63-97.97
	6	PW x MIR tratado	54.71	19.34	12.62-79.36
	8	SYN-IR162-4	58.24	31.19	8.68-129.22
Grano R6	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	36.5	6.22	25.3-51.49
	6	PW x MIR tratado	39.74	7.04	23.38-54.69
	8	SYN-IR162-4	45.04	8.35	33.31-64.99

MIR: SYN-IR162-4
PW: MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6
NA: No Disponible
ND: No Detectable

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

Tabla 6: Niveles de expresión de la proteína PMI (ng/mg)

Tejido	Entrada	Descripción	PMI ng/mg		
			Promedio	Desvío estándar (n=10)	Min/Max
Hoja V2-V4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	9.09	2.08	6.37-15.25
	6	PW x MIR tratado	9.35	2.12	5.48-13.44
	8	SYN-IR162-4	10.32	1.97	7.58-14.31
Hoja V9	1	Control	0.65	3.19	ND-15.64
	5	PW x MIR no tratado	6.77	1.98	ND-9.52
	6	PW x MIR tratado	7.76	2.08	5.15-11.43
	8	SYN-IR162-4	8.49	3.09	3.73-15.81
Hoja R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	10.69	2.88	6.09-16.45
	6	PW x MIR tratado	10.33	2.18	6.08-13.66
	8	SYN-IR162-4	10.94	3.63	6.05-23.2
Raíz R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	1.22	0.59	0.47-2.45
	6	PW x MIR tratado	1.18	0.57	0.54-2.85
	8	SYN-IR162-4	0.96	0.45	0.33-2.35
Polen R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	3.65	0.62	2.56-5.92
	6	PW x MIR tratado	4.04	0.32	3.15-4.68
	8	SYN-IR162-4	3.16	0.86	1.22-4.59
Forraje R4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	2.21	0.83	0.71-4.58
	6	PW x MIR tratado	2.46	0.61	1.18-3.79
	8	SYN-IR162-4	2.41	0.82	1.26-4.22
Grano R6	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	2.03	0.33	1.43-2.6
	6	PW x MIR tratado	2.24	0.48	1.2-3.46
	8	SYN-IR162-4	2.14	0.46	1.44-3.13

MIR: SYN-IR162-4

PW: MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6

NA: No Disponible

ND: No Detectable

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

Tabla 7: Niveles de expresión de la proteína CP4ESPS (ng/mg)

Tejido	Entrada	Descripción	CP4 EPSPS ng/mg		
			Promedio	Desvío estándar (n=10)	Min/Max
Hoja V2-V4	1	Control	0	0.01	ND-0.03
	5	PW x MIR no tratado	186.39	32.79	123.66-241.34
	6	PW x MIR tratado	173.1	41.01	112.52-244.11
	11	MON-00603-6	179.78	42.28	103.09-264.01
Hoja V9	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	139.6	41.37	ND-204.93
	6	PW x MIR tratado	149.56	26.55	106.47-194.97
	11	MON-00603-6	201.44	42.65	129.12-312.56
Hoja R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	200.95	54.43	118.69-334.51
	6	PW x MIR tratado	192.04	71.17	115.1-359.15
	11	MON-00603-6	220.79	55.87	99.51-334.46
Raíz R1	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	14.23	4.24	8.43-22.09
	6	PW x MIR tratado	15.02	3.84	7.87-24.0
	11	MON-00603-6	12.75	6.08	5.86-36.82
Polen R1	1	Control	0.01	0.01	ND-0.03
	5	PW x MIR no tratado	306.76	55.91	210.74-420.7
	6	PW x MIR tratado	443.06	102.04	257.52-669.82
	11	MON-00603-6	473.76	82.14	222.37-601.23
Forraje R4	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	24.04	9.37	9.43-48.67
	6	PW x MIR tratado	25.95	10.33	10.64-49.72
	11	MON-00603-6	23.4	10.49	8.81-51.74
Grano R6	1	Control	NA	NA	ND-ND
	5	PW x MIR no tratado	10.26	2.45	4.39-16.58
	6	PW x MIR tratado	13.46	4.46	3.45-22.31
	11	MON-00603-6	9.64	2.32	3.17-14.23

MIR:

SYN-IR162-4

PW: MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6

NA: No Disponible

ND: No Detectable

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

El estudio detectó la presencia de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, PMI, Vip3A20 y CP4EPSPS en un pequeño número de muestras de tejidos del control isogénico, como consecuencia de una contaminación cruzada sufrida durante la toma de muestras o durante su procesamiento. Sin embargo, sus valores fueron aislados, esporádicos y, en algunos casos, no cuantificables. Por ende, estos registros no afectaron las conclusiones del estudio.

Por su parte, en el evento acumulado, los niveles de expresión de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, PAT, Vip3A20, PMI y CP4EPSPS, fueron consistentes con los niveles obtenidos en los correspondientes parentales.

Estos resultados confirman que la presencia simultánea de las proteínas introducidas en el evento acumulado, no modificó los niveles y patrones de expresión de cada una de las proteínas en sus respectivos eventos parentales.

3. Potencial tóxico o alergénico.

3.1 Productos de expresión:

Los estudios realizados con el fin de determinar posibles efectos tóxicos o alergénicos de las nuevas proteínas expresadas, fueron evaluados oportunamente en instancias de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales, resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos. No existen razones para suponer que estas características hayan cambiado en el maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162.

3.2. Nuevos péptidos putativos:

Los estudios realizados en los sitios de integración de cada uno de los eventos parentales, con el fin de determinar la posible generación de nuevos marcos de lectura abiertos y/o nuevos péptidos putativos, fueron evaluados oportunamente en instancias de sus solicitudes de liberación comercial, resultando en Documentos de Decisión favorables. No existen razones para suponer que estas características hayan cambiado en el maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162.

4. Composición centesimal del OVGM:

A partir de estudios composicionales comparativos del maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 con la isolínea convencional, se determinaron los niveles de diversos componentes en muestras de grano (R6) y forraje (R5) obtenidas de ensayos a campo realizados en 8 localidades de Argentina durante la campaña 2014/2015.

Además, con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo de maíz, se incluyeron 6 variedades comerciales de referencia.

Con el fin de controlar la probabilidad de que cada diferencia declarada sea significativa, se realizó un ajuste de los valores-p mediante un procedimiento de control de coeficiente de falsos positivos (False Discovery Rate; FDR).

El estudio realizado sobre las muestras de forraje analizó el contenido de proximales, fibras y minerales, que incluyeron proteínas, lípidos, cenizas, humedad, carbohidratos, fibra detergente ácido (FDA), fibra detergente neutra (FDN), calcio y fósforo. Todos los valores promedio estuvieron dentro de las líneas de referencia y/o dentro de los rangos de la literatura. A su vez, ninguno de los componentes evaluados

presentó diferencias estadísticamente significativas, ya que si bien en principio, el valor promedio en cenizas indicó una diferencia significativa entre el evento acumulado y la isolínea, los valores-p ajustados por FDR no mantuvieron dicha diferencia.

Para el caso de las muestras de grano, además de los proximales, fibras y minerales antes mencionados, el estudio incluyó Fibra Dietaria Total y amplió a diez la cantidad de minerales evaluados. Por otra parte, también se midió el contenido de aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, toxinas y factores anti-nutricionales naturalmente presentes en el maíz. Los datos obtenidos evidencian que la mayoría de los componentes evaluados no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el evento acumulado y la isolínea. A su vez, los pocos casos donde los analitos presentaron alguna diferencia significativa, incluso los ajustados por FDR, se observó que todos los valores obtenidos estuvieron dentro del rango de la literatura científica. Por lo tanto, las diferencias observadas no fueron consideradas biológicamente relevantes.

A los fines del presente documento estos resultados se consideran indicativos de la ausencia de efectos no esperados producto de la transformación genética.

5. Potencial para producir impactos en el agroecosistema.

5.1. Comportamiento agrofenotípico:

La evaluación agrofenotípica para el evento MON89034xTC1507xNK603xMIR162 se llevó a cabo en ocho (8) localidades de Argentina, durante la campaña 2014/2015.

Se compararon las plantas de maíz portadoras del evento acumulado con el maíz convencional y se tomó un rango generado por los materiales de referencia, actualmente comerciales en el mercado, como contexto de la variabilidad natural. Para las variables que fueron analizadas en forma estadística, se realizó el ajuste por FDR.

Las características evaluadas fueron: stand inicial (V2-V3) y final (R6) de plantas, vigor de plántula (V2-V3), altura de la planta (VT), unidades térmicas al 50% de liberación de polen y emisión de estigmas, viabilidad de polen (forma y color a los 0 min., 30 min. y 60 min. luego de la colección), vuelco de raíz y tallo, unidades térmicas a madurez, permanencia de tejidos verdes de la planta, rendimiento, humedad del grano, peso de 100 semillas, número de espiga /planta, altura de la espiga, espigas caídas, respuesta a estreses abióticos, susceptibilidad a plagas y enfermedades. Si bien se encontraron algunas diferencias significativas, estas no se mantuvieron cuando se realizó el ajuste por FDR.

Adicionalmente, se compararon las características agrofenotípicas del evento MON89034xTC1507xNK603xMIR162 con aplicación de glifosato y glufosinato de amonio respecto a las del maíz convencional. Las diferencias significativas encontradas no se mantuvieron cuando se realizó el ajuste por FDR, a excepción del parámetro “unidades térmicas al 50% de liberación de polen”. Para este caso, el evento acumulado presentó un aumento de 28,5 unidades térmicas al 50% de liberación de polen en promedio en comparación a su contraparte convencional. Sin embargo, esta diferencia no fue considerada biológicamente relevante ya que se encontró dentro del rango de las variedades de referencia.

Los resultados obtenidos demostraron que las plantas de maíz objeto de la presente solicitud, en forma comparativa con la isolínea de maíz convencional, tienen un comportamiento agronómico que no se ha modificado más allá de las características intencionalmente introducidas.

La evaluación de posibles efectos de las proteínas Cry1A105, Cry2Ab2, Cry1F y Vip3Aa20 sobre organismos no blanco pertenecientes a distintos grupos funcionales de artrópodos relevantes para el agroecosistema local, se realizó oportunamente en instancias de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales, resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos. No existen razones para suponer que estas características hayan cambiado en el maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162.

Al no existir hipótesis de riesgo asociadas a los restantes organismos que se hallan presentes en el agroecosistema local, no se considera necesaria la realización de estudios específicos para los mismos.

Por lo tanto, se concluye que el cultivo de maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 no presenta 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:

Los estudios de poder germinativo y dormición fueron evaluados en instancia de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales MON89034, TC1507, NK603 y MIR162 resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos. Dado que el evento acumulado fue obtenido por cruzamiento convencional de los parentales

anteriormente mencionados, se evaluó el recuento inicial de plantas (sección II 5.1) como indicador indirecto del poder germinativo.

Este resultado indica que, en comparación con el maíz convencional, el evento MON89034xTC1507xNK603xMIR162 no posee mayor capacidad de sobrevivir sin asistencia humana.

Se concluye que los genes cuya expresión determinan el fenotipo de resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, sólo confieren una ventaja selectiva al maíz GM cuando se lo expone a las plagas y herbicidas ya mencionados, pero ello no es suficiente para que la planta adquiera características de maleza.

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

La biología reproductiva del maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 no es diferente a la del maíz no GM; además, no existen en el país especies cultivables ni silvestres sexualmente compatibles con este cultivo.

A partir de la literatura científica disponible hasta el momento se sabe que no existen casos de transferencia horizontal desde maíz hacia microorganismos, vectores virales o insectos. Por lo tanto, no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en el evento del presente documento.

Las características de este maíz, al igual que cualquier otro maíz no GM, determinan que es improbable que pueda transferirse material genético desde los alimentos hacia los consumidores, o los microorganismos presentes en su tracto digestivo, como consecuencia de su ingesta. 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:

Si bien algunos de los elementos genéticos (promotores, terminadores, etc) presentes en los eventos individuales que forman parte del maíz acumulado provienen de fitopatógenos, no se encuentran riesgos de patogenicidad conferidos por dichos elementos.

Debido a que el maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 se obtuvo por cruzamiento convencional, no existen razones para suponer que estas características hayan cambiado en dicho evento.

6. Análisis sobre la posible interacción de los productos de expresión

Se evaluó la posibilidad de interacción entre los nuevos productos de expresión (CP4EPSPS, PAT, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F y Vip3Aa20) en el evento acumulado mediante el análisis de los mecanismos de acción, niveles de expresión, ensayos de eficacia, comportamiento agrofenotípico y estudios composicionales.

En primer lugar, a partir de literatura científica, se sabe que las proteínas que confieren tolerancia a herbicidas (CP4EPSPS y PAT) son enzimas que actúan en rutas metabólicas diferentes, a la vez que poseen distintos mecanismos de acción (sección I, 3.3.a.).

Sumado a lo anterior, la presencia simultánea de las proteínas no modificó la tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio. Dicho ensayo fue evaluado en instancia de la solicitud de liberación comercial del evento MON89034xTC1507xNK603, resultando en un Documento de Decisión favorable.

Para el caso de las proteínas insecticidas, estudios previos demostraron que Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F y Vip3Aa20 actúan sobre el mismo Orden de insectos (Lepidoptera). Ensayos de interacción de proteínas realizados sobre el evento acumulado en condiciones de laboratorio, no evidenciaron cambios en la actividad insecticida de las mismas en comparación con los eventos parentales.

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

Por su parte, los estudios agrofenotípicos (sección II, 5.1 y 5.2) y composicionales (sección II, 4) demostraron que el evento acumulado no presenta diferencias biológicamente relevantes, respecto a su isohíbrido convencional.

Estos resultados tomados en conjunto constituyen evidencia consistente para inferir que no existe interacción entre las seis proteínas expresadas en el evento MON89034xTC1507xNK603xMIR162.

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:

Dow AgroSciences Argentina desarrolló un plan de manejo responsable del maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162 con el fin de retrasar la selección de resistencia de las especies que ejercen mayor presión sobre el cultivo: *Diatraea saccharalis* y *Spodoptera frugiperda*. El mismo incluyó un modelo de simulación predictivo de la durabilidad del evento donde se tuvieron en cuenta dos escenarios distintos: sin presencia de refugio y con refugio estructurado del 5%. Dicho modelo preve que el refugio en bloque de maíz no Bt de al menos 5% de la superficie es suficiente para garantizar la durabilidad de la tecnología por 200 generaciones de *Diatraea saccharalis* en situaciones donde no haya resistencia previa a la proteína Cry1F, mientras que en un escenario particular que la incluya, la durabilidad se reduce a 11 generaciones. Considerando un caso específico donde no se implemente refugio (escenario sin resistencia previa y sin considerar refugios naturales y hospedantes alternativos disponibles en el agroecosistema), el modelo predictivo prevé una durabilidad aún menor del evento acumulado .

Por otro lado, para *Spodoptera frugiperda*, bajo un escenario conservador de resistencia previa a Cry1F y refugio del 5% (contemplando aplicación de insecticida), la durabilidad de la tecnología se estimó en 182 generaciones de la especie mencionada. Esta disminuyó marcadamente cuando no se implementó refugio.

Los resultados obtenidos en el modelo demuestran que el cumplimiento de la utilización de refugio estructurado de al menos el 5% tiene un efecto positivo significativo en la durabilidad de MON89034xTC1507xNK603xMIR162.

Dow AgroSciences Argentina, también propone una estrategia de Manejo Integrado de Plagas en la cual se contempla el uso de múltiples herramientas:

- A. Rotación de cultivos
- B. Desección anticipada y mantenimiento del cultivo libre de malezas hospederas de la plaga.
- C. Uso racional de insecticidas como complemento de la protección otorgada por los transgenes:
 - a. Monitoreo temprano de los lotes (previo a la siembra) y eventualmente, control químico de plagas previo a la siembra.
 - b. Siembra de maíces Bt tratados con curasemillas insecticidas.

c. Monitoreo del cultivo desde etapas tempranas, evaluación del nivel de daño y control químico en caso de haberse alcanzado el umbral de daño; y eventualmente, aplicación de productos en las dosis y momentos recomendados, rotando los principios activos de los insecticidas.

D. Preservación de los enemigos naturales.

E. Siembra, tipo y diseño espacial de refugio

Para extender la durabilidad del evento MON89034xTC1507xNK603xMIR162 se considera necesario implementar un refugio estructurado en bloque, utilizando al menos 5% de la superficie con un material no Bt de ciclo igual o similar a la variedad Bt. El refugio debe ser sembrado de manera simultánea al cultivo Bt, pudiendo utilizarse cualquier variedad no Bt. La siembra debe ser realizada de manera que no haya más de 1500 m continuos de maíz sin refugio. La información disponible hasta el momento sobre la biología de *Spodoptera frugiperda* no apoya la estrategia de refugio en bolsa, por lo cual se recomienda que el refugio sea exclusivamente estructurado.

En caso de aplicar insecticidas se debe considerar el nivel y umbral de daño económico para cada plaga. El solicitante indicará a los productores que no utilicen en el refugio insecticidas microbianos a base de *Bacillus thuringiensis*. La aplicación deberá realizarse teniendo en cuenta los principios de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

Dow AgroSciences Argentina desarrollará un Plan de Comunicación y Capacitación para los productores que será definido previo al lanzamiento del evento MON89034xTC1507xNK603xMIR162 e incluirá: demostraciones a campo, capacitaciones, reuniones con los productores, visitas, 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.

Ante la detección por parte del productor de una situación de daño no esperado en el cultivo podrá reportarlo a Dow AgroSciences Argentina S.A. a través de los canales de ventas (distribuidores y vendedores) y de personal técnico presente en la zona.

La empresa procederá a evaluar la situación y, si ésta lo requiriera, realizará colectas de insectos para realizar ensayos de laboratorio que permitan analizar variaciones en la susceptibilidad de la población a la/s proteína/s.

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

La empresa procederá a realizar 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. 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

8. Recomendaciones:

En función de las características del maíz MON89034xTC1507xNK603xMIR162, y 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 y glufosinato de amonio, 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 a través de alguno de los canales de comunicación. En caso de confirmarse la resistencia, se recomienda que el solicitante asista al productor proponiendo acciones de mitigación.