

MONSANTO COMERCIAL, S. DE R. L. DE C. V.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913

30/03/2023

**REGIÓN DE TAMAULIPAS NORTE – PV - 2024.
ECORREGIÓN PLANICIE COSTERA TAMAULIPECA**

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

CONTENIDO

Art. 5° RLBOGM.....	11
I. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DEL PROMOVENTE Y, EN SU CASO, NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL;.....	11
II. DOMICILIO PARA OÍR Y RECIBIR NOTIFICACIONES, ASÍ COMO EL NOMBRE DE LA PERSONA O PERSONAS AUTORIZADAS PARA RECIBIRLAS;.....	11
III. DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO PARA RECIBIR NOTIFICACIONES, EN CASO DE QUE EL PROMOVENTE DESEE SER NOTIFICADO POR ESTE MEDIO;.....	12
IV. MODALIDAD DE LA LIBERACIÓN SOLICITADA Y LAS RAZONES QUE DAN MOTIVO A LA PETICIÓN;.....	12
V. SEÑALAR EL ÓRGANO DE LA SECRETARÍA COMPETENTE, AL QUE SE DIRIGE LA SOLICITUD;.....	15
VI. LUGAR Y FECHA, Y.....	15
VII. FIRMA DEL INTERESADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL, O EN SU CASO, HUELLA DIGITAL.....	15
ART. 16 RLBOGM.....	15
I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	15
I.a. Identificador único del evento de transformación de organismos internacionales de los que México se parte, cuando exista.....	46
I.b. Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México.....	46
I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles.....	49
I.d. Hábitats de persistencia o proliferación.....	53
I.e. Descripción taxonómica del organismo receptor y donador.....	55
I.f. País o localidad donde el OGM fue colectado (USA).....	56
I.g. Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor.....	56
I.h. Secuencia génica del evento de transformación (tamaño del fragmento, sitio de inserción y oligonucleótidos).....	62
I.i. Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros.....	62
SECUENCIAS FLANQUEANTES.....	62
NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS.....	63
EXPRESIÓN.....	67

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

I.j. Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres, expresión de las proteínas y su localización.....	80
MAPA DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA.	80
TIPO DE HERENCIA DE LOS CARACTERES.	80
EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	85
LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTRODUCIDAS.....	85
I.k. Descripción del método de transformación.	85
I.l. Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de efectos no esperados.	89
I.m. Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples.	100
I.n. Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgén y sus cambios.....	110
mCry51Aa2.....	110
Cry1Ac.....	110
Cry2Ab.....	111
CP4 EPSPS.....	112
I.o. Productos de degradación de la proteína codificada por el transgén en subproductos. .	117
PROTEÍNAS mCry51Aa2, Cry1Ac y Cry2Ab.	117
Vip3A.....	121
CP4 EPSPS.....	121
DMO.	122
PAT.....	122
I.p. Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras (promotores, terminadores y otras), descripción, número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora.	123
I.q. Patogenicidad o virulencia de los organismos receptores y donadores.	131
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac y Cry2Ab y Vip3A).	131
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4 (Proteína CP4 EPSPS).....	133
I.r. Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotipo que confiere estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de estos genes.....	136

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

I.s. Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgén.....	138
I.t. Referencia bibliográfica sobre los datos presentados	143
II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM.....	162
II.a. Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.....	162
II.b. Ubicación del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.	162
II.c. Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas según características de diseminación.	171
III. IDENTIFICACIÓN DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA.	180
III.a. Estabilidad de la modificación genética del OGM.	180
III.b. Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína en diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren.	180
III.c. Características del fenotipo del OGM.	180
III.d. Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente receptor del OGM.....	181
III.e. Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto del organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica.	182
III.f. Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM.	183
III.g. Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad.	192
III.h. Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas.	193
Potencial de flujo génico mediado por polen e introgresión.....	193
Hibridación con algodón cultivado.....	193
Hibridación con otras especies del género <i>Gossypium</i>	194
III.i. Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.	195
III.j. Estudio de evaluación de los posibles riesgos conforme a la NORMA Oficial Mexicana NOM-002-SAG-BIO-SEMARNAT-2017, por la que se establecen las características y requisitos que deberán contener los estudios de evaluación de los posibles riesgos que la liberación experimental de organismos genéticamente modificados pudiera ocasionar al medio ambiente y a la diversidad biológica, así como a la sanidad animal, vegetal y acuícola.	201

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD.....	202
IV.a. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad.....	202
IV.b. Medidas y procedimientos de bioseguridad.....	203
V. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROMOVENTE.....	207
V.a. Descripción de la zona en donde se realizó la liberación.	207
V.b. Efectos de la liberación sobre la flora y fauna.	211
V.c. Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen (descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad).	214
V.d. En caso de que el promovente lo considere adecuado. Otros estudios o consideraciones en los que se analicen tanto la contribución del OGM a la solución de problemas ambientales, sociales, productivos o de otra índole.....	217
V.e. En caso de importación, copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen.....	217
VI. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RIESGOS DE LAS ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS CON QUE SE CUENTE PARA CONTENDER CON EL PROBLEMA PARA EL CUAL SE CONSTRUYÓ EL OGM, EN CASO DE QUE TALES ALTERNATIVAS EXISTAN.	218
VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O BIORREMEDIACIÓN.	220
VIII. LA PROPUESTA DE LA VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA.....	220
A. La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte.....	221
Ruta de movilización	221
Lugar de origen de la semilla:	221
Destinos intermedios:.....	222
Agencias aduanales.	222
Almacén	222

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

B. El diseño experimental que se llevará a cabo durante la liberación en fase experimental.....223

TABLAS

Tabla 1. Resumen de Elementos Genéticos en el Plásmido Vector PV-GHIR508523.....	19
Tabla 2. Resumen de Elementos Genéticos en el evento MON 88702.....	21
Tabla 3. Resumen de los elementos genéticos contenidos en el plásmido vector PV-GHBK04 utilizado para la obtención del algodón Bollgard® (MON 531).	28
Tabla 4. Resumen de los elementos genéticos presentes en el plásmido vector PV-GHBK11 utilizado en la obtención del algodón Bollgard®II (MON 15985).....	29
Tabla 5. Resumen de elementos genéticos presentes en el plásmido PV-GHGT35 utilizado en la obtención del algodón Solución Faena Flex® (MON 88913).	31
Tabla 6. Resumen de elementos genéticos presentes en el plásmido PV-GHHT6997 utilizado en la obtención del algodón DGT (MON 88701).....	33
Tabla 7. <i>Especies del género Gossypium</i> , designación de genoma y distribución ¹	52
Tabla 8. Comparaciones de características de las plantas entre <i>Gossypium hirsutum</i> ¹ silvestre y domesticado.	58
Tabla 9. Cambios en la selección de características del algodón por el proceso de domesticación a través del tiempo. ¹	59
Tabla 10. Niveles de expresión de la proteína mCry51Aa2 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.	70
Tabla 11. Niveles de expresión de la proteína Cry1Ac en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.....	71
Tabla 12. Niveles de expresión de la proteína Cry2Ab2 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.	72
Tabla 13. Niveles de expresión de la proteína NPTII en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.....	73
Tabla 14. Niveles de expresión de la proteína GUS en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.....	74
Tabla 15. Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa19 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.	75

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 16. Niveles de expresión de la proteína APH4 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.....	76
Tabla 17. Niveles de expresión de la proteína DMO en tejidos de algodón colectados de MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.....	77
Tabla 18. Niveles de expresión de la proteína PAT (<i>bar</i>) en tejidos de algodón colectados de MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.	78
Tabla 19. Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en tejidos de algodón colectados de MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.	79
Tabla 20. Secuencias de los sitios de unión detectados.	139
Tabla 21. Análisis de sitios combinados de las características fenotípicas del algodón MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 en comparación con el control convencional en las evaluaciones de campo de Estados Unidos en 2016.	183
Tabla 22. Medias y error estándar (E.E.) de la abundancia de artrópodos entre los años 2015 y 2016 colectados con lámina de golpeo en el algodón MON 88702, en comparación con el control convencional.	185
Tabla 23. Identidad en la secuencia de aminoácidos entre la proteína DMO expresada en el evento MON 88701 y otras proteínas presentes en plantas.	191

FIGURAS

Figura 1. Mapa circular de PV-GHIR508523.....	18
Figura 2. Mapa del vector pNOV3001.	23
Figura 3. Mapa del vector PV-GHBK04.....	23
Figura 4. Mapa del vector PV-GHBK11.....	24
Figura 5. Mapa del plásmido vector PV-GHGT35.	30
Figura 6. Análisis de PCR superpuesta a través del inserto en el evento DGT [®] (MON 88701). 35	
Figura 7. Amplificación por PCR del sitio de inserción del evento DGT [®] (MON 88701) en el control convencional.	36
Figura 8. Mapa circular del vector PV-GHHT6997.	37
Figura 9. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 88702 en el evento apilado MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.	39
Figura 10. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 15985 en el evento apilado MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.	40

Figura 11. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 531 en el evento apilado MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.	41
Figura 12. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 88701 en el evento apilado MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.	42
Figura 13. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 88913 en el evento apilado MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.	43
Figura 14. Representación esquemática del inserto de ADN en el evento COT102.	45
Figura 15. Puntos de colecta de ejemplares de especies silvestres del género <i>Gossypium</i> en la ecorregión nivel IV “ <i>Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente</i> ” en Tamaulipas Norte.	51
Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la proteína mCry51Aa2.	101
Figura 17. Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ac.	103
Figura 18. Secuencia de aminoácidos de la proteína neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII).	104
Figura 19. Secuencia de aminoácidos de la proteína AAD.	104
Figura 20. Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry2Ab.	105
Figura 21. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GUS.	106
Figura 22. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS.	108
Figura 23. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína DMO.	109
Figura 24. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína PAT.	109
Figura 25. Componentes del sistema rédox de DMO.	114
Figura 26. Dicamba y Sustratos endógenos potenciales analizados en experimentos <i>in vitro</i> con la proteína DMO.	115
Figura 27. Distribución de los Pueblos Indígenas Originarios en México de acuerdo con el INPI. En el estado de Tamaulipas no se encuentran pueblos indígenas originarios.	166
Figura 28. Localización geográfica de los predios candidatos en la Ecorregión 9.5.1.2. <i>Planicie Costera Tamaulipeca</i> , propuestos para las evaluaciones en Etapa Experimental.	167
Figura 29. Municipios donde se ubican los predios candidatos en la Ecorregión 9.5.1.2. <i>Planicie Costera Tamaulipeca</i>, propuestos para las evaluaciones en Etapa Experimental.	168
Figura 30. Zonas Agrícolas donde se ubican los predios candidatos en la Ecorregión 9.5.1.2. <i>Planicie Costera Tamaulipeca</i> , propuestos para las evaluaciones en Etapa Experimental.	169
Figura 31. Ninguno de los predios candidatos se localizan dentro de Áreas Naturales Protegidas.	170
Figura 32. Tipos de clima. Los predios propuestos en los municipios de Reynosa y Río Bravo se ubican en una zona de clima semiárido, cálido BS1(h')(x'), con temperatura media anual mayor a 22°C, con una temperatura mayor a 18°C en el mes más frío. Las lluvias se presentan a lo largo del año y el porcentaje de lluvia invernal es mayor al 18% del total anual. El resto de	

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

los predios situados en los municipios de Valle Hermoso y Matamoros y el predio 7 en el municipio de Río Bravo, se ubican en una zona climática (A)C(wo)x', semicálido subhúmedo del grupo C, con temperatura media anual mayor a 18°C. La temperatura del mes más frío es menor a 18°C, mientras la temperatura del mes más caliente es mayor a 22°C. Las lluvias del mes más seco son menores de 40 mm, la lluvia invernal tiene un porcentaje mayor a los 10.2% del total anual. (Köppen mod. García, 1998)..... 172

Figura 33. Características Geomorfológicas. 14 de los predios candidatos se ubican sobre planicies con una altura de 0-200 m.s.n.m. y solo el predio Tamaulipas 9 se localiza sobre lomeríos (Lugo-Hubp et al., 1992)..... 173

Figura 34. Altimetría. Los predios propuestos se ubican en una altitud entre los 0 y 100 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (INEGI, 20023). 174

Figura 35. Fallas y Fracturas. Ninguno de los predios propuestos se ubica sobre una falla o fractura. La fractura más cercana se ubica a 42 km al noroeste del predio Tamaulipas 9 que se encuentra en el municipio de Reynosa (INEGI, 2002). 175

Figura 36. Litología. En la región norte de Tamaulipas predominan rocas sedimentarias principalmente aluvial y arenisca-lutita (SGM, CGMinería y SE, 2003). 176

Figura 37. Suelo. La mayoría de los predios se ubican sobre un tipo de suelo calcisol haplico. Estos suelos calcáreos se distinguen por presentar una capa dura de caliche a menos de un metro de profundidad, una gran cantidad de calcio y, a menudo, una capa órica, características que los convierten en suelos secos e infértiles. Los calcisoles se desarrollan bajo climas áridos. El riego por surcos es más eficiente en suelos calcáreos apagados y el riego por aspersión y curvas de nivel son alternativas más eficaces en tierras onduladas. Los predios 1-4 se localizan sobre un tipo de suelo vertisol eutricto. Estos son suelos sumamente arcillosos que se desarrollan en climas de subhúmedos a secos. Son profundos, muy duros cuando están secos y lodosos al mojarse (debido a su alto contenido de arcillas), por lo que resulta difícil trabajarlos. Además, su fertilidad es intrínsecamente baja. (SEMARNAT, 2002) (IUSS Working Group WRB, 2015). 177

Figura 38. Uso de suelo y cubierta vegetal. Los predios propuestos se ubican dentro de la zona de agricultura de riego de los Municipios de Reynosa, Río Bravo, Valle Hermoso y Matamoros. El uso de suelo urbano o asentamientos humanos dentro de esta zona ocupa aproximadamente el 11% del total de la superficie, siendo las áreas más importantes la ciudad de Río Bravo, Valle Hermoso y Matamoros, y otros numerosos pequeños asentamientos humanos. En los alrededores de la zona se encuentran superficies de agricultura de temporal anual, pastizal cultivado, matorral espinoso tamaulipeco, áreas sin vegetación aparente. Hay presencia de vegetación halófila hidrófila y pastizal halófila en la Laguna Madre y parches aislados de mezquital xerófilo en Reynosa..... 178

Figura 39. Principales vías de comunicación de la zona donde se localizan los predios candidatos en la ecorregión “Planicie Costera Tamaulipeca”...... 179

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Figura 40. Liberaciones al ambiente de algodón MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 en Estados Unidos (país de origen)..... 210

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN **ETAPA EXPERIMENTAL** DEL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO ALGODÓN MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 EN ÁREAS AGRÍCOLAS DE LA ECORREGIÓN NIVEL IV 9.5.1.2 *PLANICIE COSTERA TAMAULIPECA CON VEGETACIÓN XERÓFILA O SIN VEGETACIÓN APARENTE* (en adelante “*Planicie Costera Tamaulipeca*”), DURANTE EL CICLO AGRÍCOLA PRIMAVERA-VERANO 2024.

Se entrega además el documento **Análisis de Riesgo** del evento algodón MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON-88913-8 de acuerdo a la Norma de Análisis de Riesgo NOM-002-SAG-BIO-SEMARNAT-2017 (**ANEXO 36**).

Art. 5° RLBOGM.

I. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DEL PROMOVENTE Y, EN SU CASO, NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL;

Monsanto Comercial, S. de R. L. de C. V.

Representantes legales:

M. en C. Luis Adrián Castillo León.

Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico.

Ing. José Javier Gándara Espinosa.

II. DOMICILIO PARA OÍR Y RECIBIR NOTIFICACIONES, ASÍ COMO EL NOMBRE DE LA PERSONA O PERSONAS AUTORIZADAS PARA RECIBIRLAS;

Blvd. Miguel de Cervantes Saavedra No. 259.

Col. Granada.

Alcaldía Miguel Hidalgo.

C.P.11520. CDMX, México.

Monsanto Comercial, S. de R. L. de C. V.

Personas autorizadas para recibir las notificaciones:

M. en C. Luis Adrián Castillo León.

Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico.

Ing. José Javier Gándara Espinosa.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

III. DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO PARA RECIBIR NOTIFICACIONES, EN CASO DE QUE EL PROMOVENTE DESEE SER NOTIFICADO POR ESTE MEDIO;

No se proporcionan.

IV. MODALIDAD DE LA LIBERACIÓN SOLICITADA Y LAS RAZONES QUE DAN MOTIVO A LA PETICIÓN;

Que por medio de la presente me dirijo a Usted para presentar, con base a los artículos 32 fracción I, 36, 42, 44, 46, 70 y 71 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) y los artículos 3, 5, 6, 7, 16 y 22 del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (RLBOGM), la formal Solicitud de Permiso de Liberación al Ambiente en **ETAPA EXPERIMENTAL** para el algodón **MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913**, a liberarse durante el ciclo agrícola PV-2024, en predios de las zonas agrícolas localizadas en la ecorregión nivel IV *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente* (en adelante “*Planicie Costera Tamaulipeca*”). Esto excluye cualquier otra área o tipo de asociación vegetal diferente a zonas agrícolas, así como zonas urbanas).

Los datos a obtener en las evaluaciones en Etapa Experimental del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en la ecorregión “*Planicie Costera Tamaulipeca*” (Tamaulipas Norte), aunados a los datos obtenidos en otros países, responderán los cuestionamientos sobre los posibles riesgos a la diversidad biológica, al medio ambiente y a la sanidad animal, vegetal y acuícola, de acuerdo a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), su Reglamento (RLBOGM) y a la NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013, y permitirán redactar el Reporte de Resultados de acuerdo a la citada Norma, que incluirá toda la información necesaria para responder a los requisitos de información para la Etapa Experimental.

OBJETIVOS DE LA LIBERACIÓN EXPERIMENTAL.

1.- Predios Regulatorios: Se utilizarán un máximo de 4 predios, distribuidos en las zonas agrícolas de Tamaulipas Norte (ecorregión “*Planicie Costera Tamaulipeca*”). Estos predios se escogerán de entre los predios candidatos provistos junto con esta solicitud. Su finalidad es generar información en campo para completar el análisis de riesgo y la información que se solicita por la NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

A continuación, se describe de manera específica el tipo de información a generar y los protocolos a ejecutar en cada caso:

I. EVALUACIONES EXPERIMENTALES:

Se generará información, de acuerdo con las secciones de la NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013 para la Etapa Experimental, que permita corroborar que no existen posibles riesgos a la diversidad biológica y al medio ambiente:

Protocolo 1: Caracterización Agronómica y Fenotípica e Interacciones Ambientales del Algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en Etapa Experimental en Localidades de México en 2024 (**ANEXO 1**).

1.- Documentar la equivalencia agronómica y fenotípica e interacciones ambientales del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, en comparación con el control convencional.

Protocolo 2: Eficacia biológica y abundancia de organismos no blanco en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en Etapa Experimental en Localidades de México en 2024 (**ANEXO 2**).

1.- Evaluar la eficacia biológica del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, en comparación con su contraparte convencional.

2.- Documentar las poblaciones de artrópodos (insectos objetivo e insectos no blanco) presentes en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, en comparación con el control convencional.

Se incluye información sobre las especies sexualmente compatibles con el algodón cultivado (algodones tetraploides) y sus parientes silvestres pertenecientes al género *Gossypium* (algodones diploides) (**ANEXO 37**), con los que se sabe que no se puede cruzar, para la ecorregión nivel IV "*Planicie Costera Tamaulipeca*". Las principales conclusiones son:

a) El potencial de flujo de genes desde el algodón biotecnológico a otros algodones cultivados es posible, pero bajo, ya que el polen es grande y pegajoso y su movimiento por el viento está limitado. Muchos estudios a nivel mundial han demostrado que la polinización cruzada, aún con actividad alta de polinizadores, está limitada por la distancia. Por lo que la transferencia de polen desde el algodón biotecnológico a otros algodones cultivados se considera insignificante.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- b) El flujo génico desde el algodón cultivado a formas silvestres costeras de *G. hirsutum* es posible, dado que son de la misma especie, pero es raro porque las formas silvestres ocupan un nicho ecológico en áreas costeras arenosas, lo que las aísla del algodón cultivado que se siembra en campos agrícolas tierra adentro (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014). Entonces, la probabilidad de que una característica del algodón cultivado, convencional o biotecnológico, se transfiera al algodón silvestre es remota porque no ocurren en el mismo hábitat.
- c) Si ocurriera cualquier intercambio potencial de genes entre el algodón cultivado tetraploide (AD, $2n=4x=52$) y alguna de las especies de algodón diploide (D o A, $2n=2x=26$), resultaría en plantas triploides estériles (ADD, $3n=3x=39$) por sus diferencias de ploidía. No se han encontrado híbridos entre algodones tetraploides y diploides nativos producidos naturalmente, a pesar de siembras extensivas de algodón a través de muchos años (OGTR, 2008). Por lo anterior, el flujo de genes del algodón cultivado a cualquiera de estas especies diploides en la naturaleza sea muy poco probable.
- d) Las características de tolerancia a herbicidas no proveen ventajas selectivas a las plantas de algodón biotecnológico en ambientes naturales, donde no se realizan aplicaciones de herbicidas.
- e) El algodón biotecnológico con protección contra insectos plaga objetivo es vulnerable a una amplia variedad de otras plagas que no son objetivo de la tecnología (Jones *et al.*, 1989; Trapero *et al.*, 2016), enfermedades, condiciones de estrés abiótico y/o competencia intraespecífica con especies silvestres o malezas típicas de hábitats naturales.
- f) Por todo lo anterior, el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no representa riesgos a otros algodones cultivados, algodones tetraploides silvestres o algodones diploides silvestres.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

V. SEÑALAR EL ÓRGANO DE LA SECRETARÍA COMPETENTE, AL QUE SE DIRIGE LA SOLICITUD;

Conforme al Capítulo III, artículo 10, fracciones I y II, artículo 11 y artículo 12 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y del Capítulo Único artículo 2, fracción VII del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, se dirige esta solicitud a las secretarías competentes: SADER (antes SAGARPA) y SEMARNAT en el ámbito de sus competencias.

VI. LUGAR Y FECHA, Y

Ciudad de México, a 30 de marzo de 2023.

VII. FIRMA DEL INTERESADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL, O EN SU CASO, HUELLA DIGITAL.

Se anexa copia de los poderes para los representantes legales (**ANEXO 3. Poderes Legales Monsanto Comercial, S. de R. L. De C.V.**).

ART. 16 RLBOGM

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard[®]III [que es un evento apilado por cruce mendeliana que se compone de los eventos Bollgard[®]II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex[®] (MON 88913) y DGT[®] (MON 88701).

Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).

Monsanto desarrolló el algodón MON 88702, que produce una proteína insecticida mCry51Aa2 (gen *mCry51Aa2*), derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que lo protege contra el daño por insectos hemípteros y tisanópteros plaga objetivo. El algodón MON 88702 se produjo mediante transformación de tejido de algodón mediada por *Agrobacterium*, utilizando el vector de transformación PV-GHIR508523 (Figura 1) de aproximadamente 14.6 kb (Tabla 1). Este plásmido contiene dos ADN de transformación (ADN-T) independientes, cada uno delineado por regiones borde derechas e izquierdas (**ANEXO 4. MSL0027648 Caracterización Molecular MON 88702**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El primer ADN-T, designado ADN-T I, contiene el cassette de expresión de *mCry51Aa2*. El segundo ADN-T, designado ADN-T II, contiene el cassette de expresión de *aadA*. Durante la transformación, ambos ADN-T se insertaron en el genoma del algodón. Posteriormente, a través de mejoramiento genético tradicional se seleccionaron plantas que contienen el cassette de expresión de *mCry51Aa2* (ADN-T I) y que no contienen el cassette de expresión de *aadA* (ADN-T II).

El ADN-T I contiene el cassette de expresión de la secuencia codificante de *mCry51Aa2* bajo la regulación del potenciador *FMV*, el promotor *Hsp81-2*, y la secuencia no traducida *CaMV 35S 3'*. La secuencia *FMV* es un elemento genético del ácido ribonucleico (ARN) 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (Richins *et al.*, 1987), que potencia la transcripción en la mayoría de las células vegetales (Rogers, 2000). La secuencia *Hsp81-2* es el promotor para el gen *81-2* de la proteína de shock térmico de *Arabidopsis thaliana* (Yabe *et al.*, 1994), que funciona para dirigir la transcripción en células vegetales. La secuencia *35S 3'* es la región no traducida 3' del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*), que dirige la poliadenilación del ARNm (ARN mensajero) en células vegetales (Mogen *et al.*, 1990).

El ADN-T II contiene el cassette de expresión de *aadA* bajo la regulación del potenciador *FMV* (descrito arriba), el promotor *EF-1 α* , la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto CTP2 y la secuencia no traducida *E9 3'*. El promotor *EF-1 α* consiste en las secuencias líder, promotora e intrón de *A. thaliana* que codifica el factor de elongación *EF-1 α* (Axelos *et al.*, 1989), que dirige la transcripción en células vegetales. La secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto CTP2 proviene del gen *ShkG* que codifica el péptido de tránsito de la EPSPS en *A. thaliana* (Herrmann, 1995; Klee *et al.*, 1987). La secuencia *E9 3'* es la región no traducida 3' de la familia de genes *rbcS* de *P. sativum* (chícharo) que codifica la subunidad pequeña de la proteína ribulosa bisfosfato carboxilasa (Coruzzi *et al.*, 1984), que dirige la poliadenilación del ARNm.

Se secuenció el ADN genómico de MON 88702 y el control convencional utilizando tecnología de secuenciación de siguiente generación (NGS, Next Generation Sequencing, en idioma inglés), que produce un conjunto de lecturas de secuencia cortas, distribuidas al azar, que cubren integralmente los genomas de MON 88702 y el control (Paso 1). Usando estas secuencias, se realizan búsquedas bioinformáticas para identificar y seleccionar todas las lecturas significativamente similares a la secuencia del plásmido de transformación (Paso 2). Estas lecturas seleccionadas son entonces mapeadas y analizadas para determinar la presencia/ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido o del ADN-T II, identificar los sitios de inserción y determinar el número de copias del inserto (Paso 3). Los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que se traslapan, que abarcan cualquier región identificada del inserto y regiones del ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto (Pasos 4 y 5, respectivamente); estos productos de PCR se secuencian para permitir la caracterización detallada del ADN insertado y del sitio de inserción.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Para la caracterización del evento MON 88702 se aisló ADN genómico de semilla de cinco generaciones de MON 88702 y del control convencional. Estas bibliotecas de ADN se usaron para generar lecturas de secuencia cortas de ~125 pares de bases (pb) del genoma del algodón, mediante NGS, distribuidas al azar. Después se utilizó análisis bioinformático para seleccionar lecturas que contenían las secuencias significativamente similares al plásmido de transformación y fueron analizadas a profundidad para determinar el número de insertos de ADN.

Se comparó la secuencia completa del plásmido PV-GHIR508523 (Figura 1), utilizado durante la transformación para generar el evento MON 88702, con las lecturas obtenidas del ADN de MON 88702, lo que es suficiente para caracterizar el ADN del plásmido PV-GHIR508523. Con esta información se determinaron los insertos de ADN en MON 88702 mapeando las lecturas de secuencia relativas al plásmido de transformación e identificando las regiones de unión al ADN y lecturas no apareadas adyacentes a estas uniones. Los sitios de unión del inserto de ADN y del ADN flanqueante son únicos para cada inserción (Kovalic *et al.*, 2012). Por lo tanto, los sitios de inserción pueden reconocerse analizando las lecturas de secuencia conteniendo esas uniones.

Se determinaron la secuencia completa del inserto y los flancos mediante NGS, evaluando si la secuencia del inserto era idéntica a la secuencia correspondiente del ADN-T I en el plásmido PV-GHIR508523, y si cada elemento genético del inserto estaba intacto. También se caracterizó la secuencia flanqueante más allá del inserto, correspondiente al ADN genómico del algodón transformado.

Se evaluó la organización intacta de los elementos en el inserto de ADN por PCR, utilizando ADN genómico de la generación R4 de MON 88702, para amplificar y secuenciar dos amplicones superpuestos de ADN que abarcan el inserto completo y la secuencia de ADN flanqueante asociada. Los productos de PCR fueron secuenciados. Los resultados confirmaron un único inserto en MON 88702 de 3,143 pb (ADN-T I), que cada elemento genético en el inserto está intacto y que la secuencia del inserto es idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido PV-GHIR508523 (Tablas 1 y 2). Además, se demostró que MON 88702 no contiene elementos del esqueleto del plásmido PV-GHIR508523 o del ADN-T II. Esto se confirmó para múltiples generaciones de MON 88702 utilizando NGS, para lo que se utilizó ADN de cinco generaciones de MON 88702. Con esto se demostró la estabilidad generacional del inserto de ADN-T I en MON 88702.

El número de copias insertadas se determinó identificando el número de secuencias de unión del inserto y el ADN genómico del algodón. Se identificaron dos sitios de unión en MON 88702 conteniendo la secuencia de unión entre el ADN-T I y el ADN genómico flanqueante de la planta. Como tal, éstos representan las secuencias en los sitios de unión planeados del inserto

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

de ADN-T I y el ADN genómico, confirmando que hay una sola copia del inserto en MON 88702.

El alineamiento completo con la secuencia inserto/flanco confirma que ambos sitios de unión se originan del mismo *locus* del genoma de MON 88702 y están ligados por ADN contiguo que conforma el inserto individual.

En conjunto, los resultados de esta caracterización demuestran que MON 88702 contiene una sola copia del inserto ADN-T I, conteniendo el cassette de expresión de la secuencia codificante de *mCry51Aa2*, que el inserto no contiene secuencias del esqueleto del plásmido y se encuentra integrado de manera estable en un *locus* individual y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos a través de múltiples generaciones (**ANEXO 5. Solicitud MON 88702 FDA**).

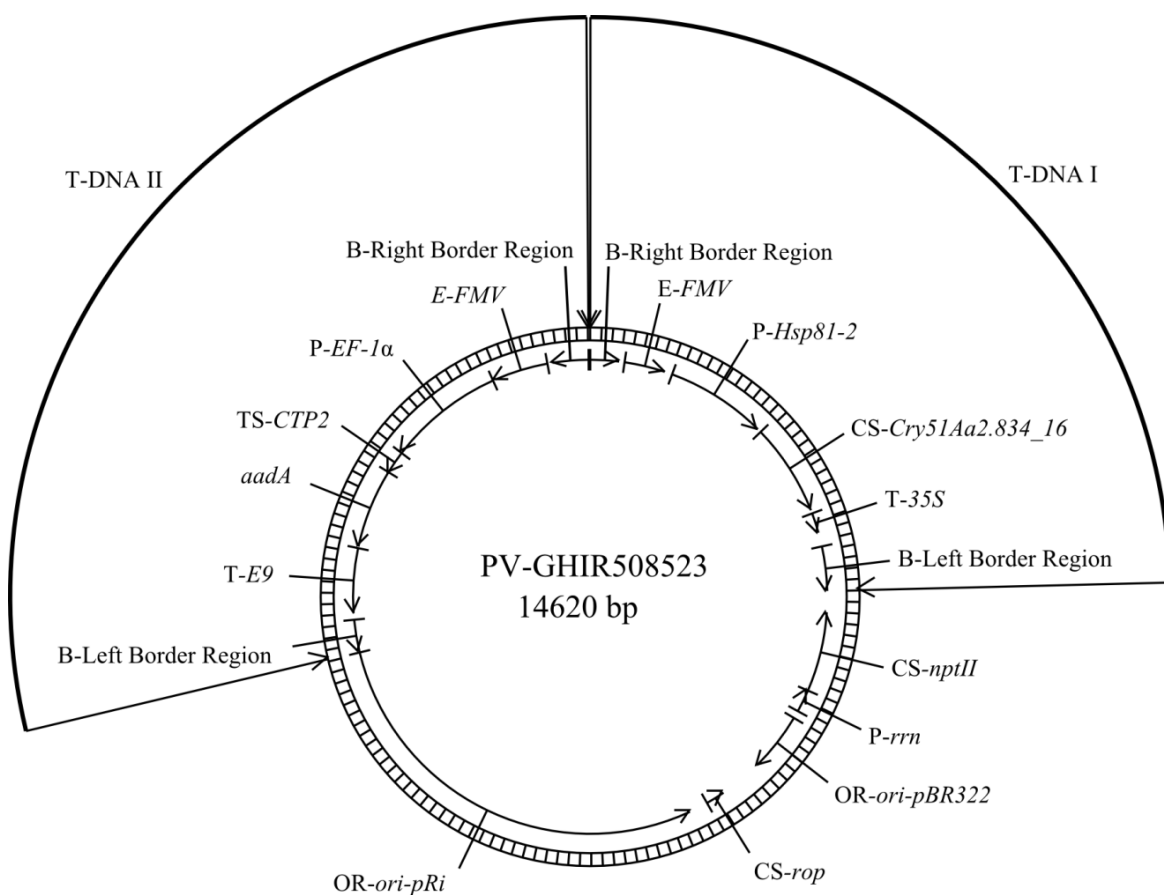


Figura 1. Mapa circular de PV-GHIR508523.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 1. Resumen de Elementos Genéticos en el Plásmido Vector PV-GHIR508523.

Elemento Genético	Localización en el Plásmido Vector	Función (Referencia)
ADN-T I		
B¹-Región Borde Derecho	1-285	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del borde derecho utilizada para la transferencia del ADN-T (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982).
Secuencia Accesoría	286-338	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
E²-FMV	339-745	Potenciador del RNA 35S del virus del mosaico de la <i>Scrophularia</i> (FMV) (Richins <i>et al.</i> , 1987) incrementa la transcripción en la mayoría de las células vegetales (Rogers, 2000).
Secuencia Accesoría	746-820	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
P³-Hsp81-2	821-1828	Promotor y secuencia líder 5' no traducida de la proteína de shock térmico 81-2 (Hsp81-2) de <i>Arabidopsis thaliana</i> que dirige la transcripción en células vegetales (Yabe <i>et al.</i> , 1994).
Secuencia Accesoría	1829-1865	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
CS⁴-Cry51Aa2.834_16	1866-2786	Secuencia codificante de la proteína modificada Cry51Aa2 de <i>Bacillus thuringiensis</i> que provee resistencia a insectos (Anderson <i>et al.</i> , 2015; Baum <i>et al.</i> , 2012).
Secuencia Accesoría	2787-2818	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
T⁵-35S	2819-3018	Secuencia 3' no traducida del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Mogen <i>et al.</i> , 1990) que dirige la poliadenilación en células vegetales.
Secuencia Accesoría	3019-3156	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
B-Región Borde Izquierdo	3157-3598	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del borde izquierdo utilizada para la transferencia del ADN-T (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Esqueleto del Vector		
Secuencia Accesoría	3599-3807	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
CS-nptII	3808-4602	Secuencia codificante del gen <i>neo</i> del transposón Tn5 de <i>Escherichia coli</i> codificando la neomicina fosfotransferasa (NPTII) (Beck <i>et al.</i> , 1982) que confiere resistencia a neomicina y kanamicina (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
P-rrn	4603-4827	Promotor del operón de ARN ribosomal de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Bautista-Zapanta <i>et al.</i> , 2002) que dirige la transcripción en bacterias.
Secuencia Accesoría	4828-4903	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
OR⁶-ori-pBR322	4904-5492	Origen de replicación del plásmido pBR322 para mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i> (Sutcliffe, 1979).
Secuencia Accesoría	5493-5919	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
CS-rop	5920-6111	Secuencia codificante para el represor del iniciador en el plásmido ColE1 para mantenimiento de un número bajo de

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Elemento Genético	Localización en el Plásmido Vector	Función (Referencia)
		copias del plásmido en <i>E. coli</i> (Giza y Huang, 1989).
Secuencia Accesorias	6112-6299	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
OR-ori-pRi	6300-10413	Origen de replicación del plásmido pRi para mantenimiento del plásmido en <i>Agrobacterium</i> (Ye <i>et al.</i> , 2011).
Secuencia Accesorias	10414-10420	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
ADN-T II		
B- Región Borde Izquierdo	10421-10739	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia borde izquierda utilizada para la transferencia del ADN-T (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia Accesorias	10740-10803	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
T-E9	10804-11446	Secuencia 3' no traducida de la familia de genes <i>rbcS</i> de <i>Pisum sativum</i> que codifica la subunidad pequeña de la proteína ribulosa bisfosfato carboxilasa (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984) que dirige la poliadenilación del ARN mensajero (ARNm).
Secuencia Accesorias	11447-11461	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
aadA	11462-12253	Promotor bacteriano, secuencia codificante, y región no traducida 3' para la enzima modificante de aminoglicósidos, 3''(9)-O-nucleotidiltransferasa del transposón Tn7 (Fling <i>et al.</i> , 1985) que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomina.
TS⁷-CTP2	12254-12481	Secuencia del gen <i>ShkG</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica la región del péptido de tránsito para EPSPS que dirige el transporte de la proteína al cloroplasto (Herrmann, 1995; Klee <i>et al.</i> , 1987).
Secuencia Accesorias	12482-12490	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
P-EF-1α	12491-13638	Promotor, secuencia líder y secuencia del intrón del gen <i>EF-1α</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica el factor de elongación EF-1α que dirige la transcripción en células vegetales (Axelos <i>et al.</i> , 1989).
Secuencia Accesorias	13639-13661	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
E-FMV	13662-14198	Potenciador del RNA 35S del virus del mosaico de la <i>Scrophularia</i> (FMV) (Richins <i>et al.</i> , 1987) incrementa la transcripción en la mayoría de las células vegetales (Rogers, 2000).
Secuencia Accesorias	14199-14248	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
B- Región Borde Derecho	14249-14605	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del borde derecho utilizada para la transferencia del ADN-T (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982).
Esqueleto del Vector		
Secuencia Accesorias	14606-14620	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.

¹ B, Borde.² E, Potenciador.³ P, Promotor⁴ CS, Secuencia codificante.⁵ T, Secuencia de Terminación de la Transcripción.⁶ OR, Origen de Replicación.⁷ TS, Secuencia diana.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS**Tabla 2. Resumen de Elementos Genéticos en el evento MON 88702.**

Elemento Genético	Localización en la Secuencia	Función (Referencia)
ADN flanqueante	1-1642	ADN flanqueante.
B¹-Región Borde Derecho	1643-1710	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del borde derecho utilizada para la transferencia del ADN-T (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982).
Secuencia Accesoría	1711-1763	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
E²-FMV	1764-2170	Potenciador del RNA 35S del virus del mosaico de la <i>Scrophularia</i> (FMV) (Richins <i>et al.</i> , 1987) incrementa la transcripción en la mayoría de las células vegetales (Rogers, 2000).
Secuencia Accesoría	2171-2245	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
P³-Hsp81-2	2246-3253	Promotor y secuencia líder 5' no traducida de la proteína de shock térmico 81-2 (Hsp81-2) de <i>Arabidopsis thaliana</i> que dirige la transcripción en células vegetales (Yabe <i>et al.</i> , 1994).
Secuencia Accesoría	3254-3290	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
CS⁴-Cry51Aa2.834_16	3291-4211	Secuencia codificante de la proteína modificada Cry51Aa2 de <i>Bacillus thuringiensis</i> que provee resistencia a insectos (Anderson <i>et al.</i> , 2015; Baum <i>et al.</i> , 2012).
Secuencia Accesoría	4212-4243	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
T⁵-35S	4244-4443	Secuencia 3' no traducida del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Mogen <i>et al.</i> , 1990) que dirige la poliadenilación en células vegetales.
Secuencia Accesoría	4444-4581	Secuencia utilizada en la clonación de ADN.
B- Left Border Region^{r1}	4582-4785	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del borde izquierdo utilizada para la transferencia del ADN-T (Barker <i>et al.</i> , 1983).
ADN flanqueante	4786-6748	ADN flanqueante.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Bollgard®III (Desarrollado por Monsanto bajo contrato de licenciamiento del evento COT102) y los eventos comprendidos en él (COT102 x Bollgard®II).

Monsanto desarrolló el algodón Bollgard®III, evento apilado que presenta protección contra el ataque de insectos lepidópteros plaga objetivo, mediante cruce mendeliana convencional entre el evento Bollgard®II (MON 15985) de Monsanto y el evento COT102 de Syngenta. Esto se realizó bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína insecticida Vip3Aa19 (en adelante “Vip3A”), aislada de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88. De igual manera, el evento MON 15985 se produjo a través de la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), variedad DP50B. El algodón MON 531 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* en algodón. Ambos eventos (COT102 y MON 15985) proveen protección contra daños por ataque de varias especies de insectos lepidópteros plaga del algodón.

Se realizó análisis de hibridación Southern blot para confirmar la presencia de los insertos de los eventos COT102 y MON 15985 en el producto apilado Bollgard®III (COT102 x MON 15985). El patrón de bandas (Southern blot) de los eventos individuales COT102 y MON 15985 se determinaron previamente (Artim, 2002; Groat y Masucci, 2008; Taylor *et al.*, 2009). Se extrajo ADN genómico de hojas de algodón COT102, MON 15985 y de un control convencional utilizando el método CTAB. Se usaron los vectores pNOV3001 (Figura 2), PV-GHBK04 (Figura 3) y PV-GHBK11 (Figura 4) como referencias. Se utilizó ADN extraído de estos vectores, y digerido con enzimas, como controles para el análisis de hibridación Southern blot. Se confirmó la identidad de los vectores mencionados por digestión con enzimas de restricción previo a su uso en el estudio. Además, se utilizaron marcadores de peso molecular apropiados de fuentes comerciales para estimaciones de tamaños de los Southern blots en geles de agarosa.

Las enzimas de restricción se escogieron para producir al menos dos fragmentos del borde conteniendo una porción del ADN del inserto con el ADN flanqueante adyacente cada uno. Estos fragmentos juntos cubren los insertos completos de COT102 y MON 15985 (Artim, 2002; Groat y Masucci, 2008; Taylor *et al.*, 2009). La presencia de los mismos fragmentos en el evento apilado Bollgard®III, así como en cada evento individual (COT102 y MON 15985) indica que los insertos y el ADN flanqueante se heredaron exitosamente en el evento apilado durante la cruce y programa de mejoramiento (**ANEXO 6. MSL0024592 Southern blot confirma COT102 y MON 15985 en Bollgard 3**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

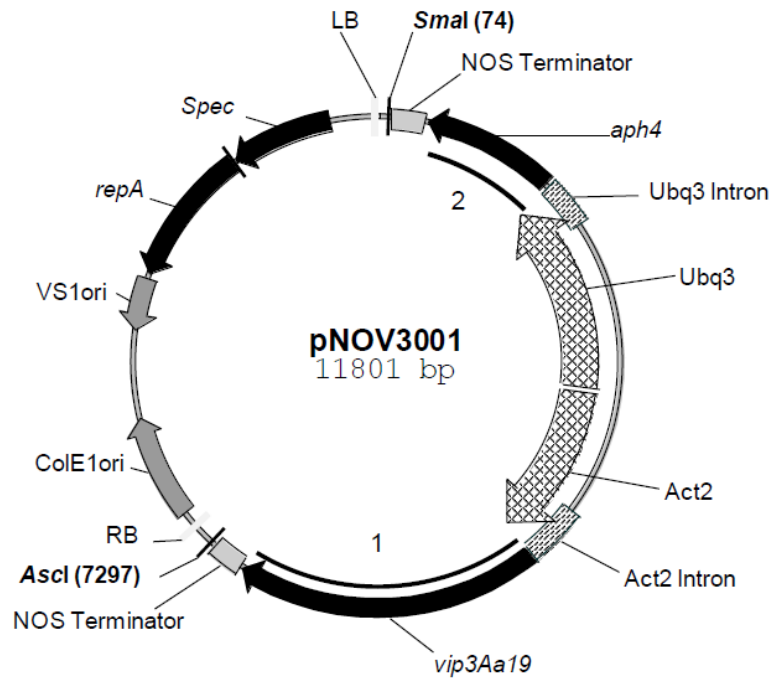


Figura 2. Mapa del vector pNOV3001.

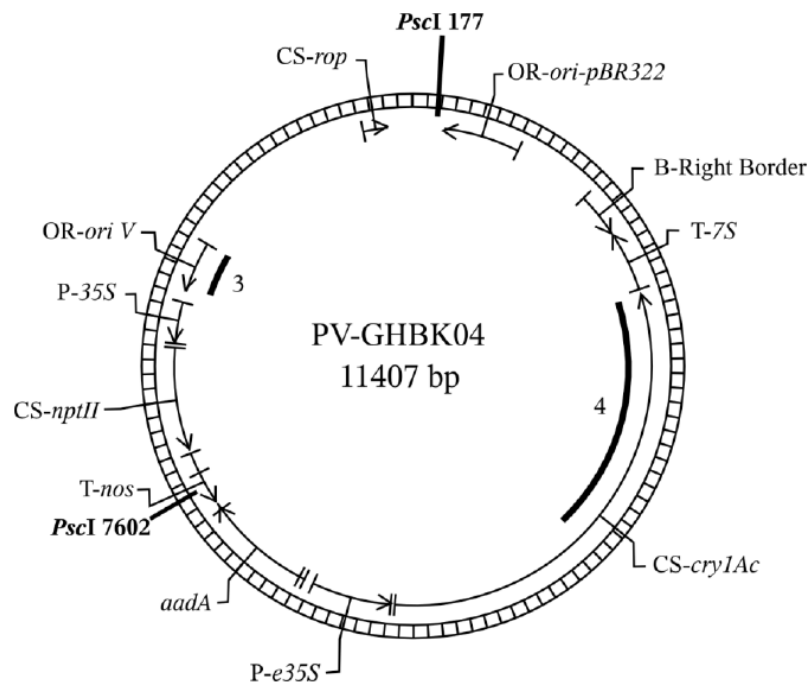


Figura 3. Mapa del vector PV-GHBK04.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

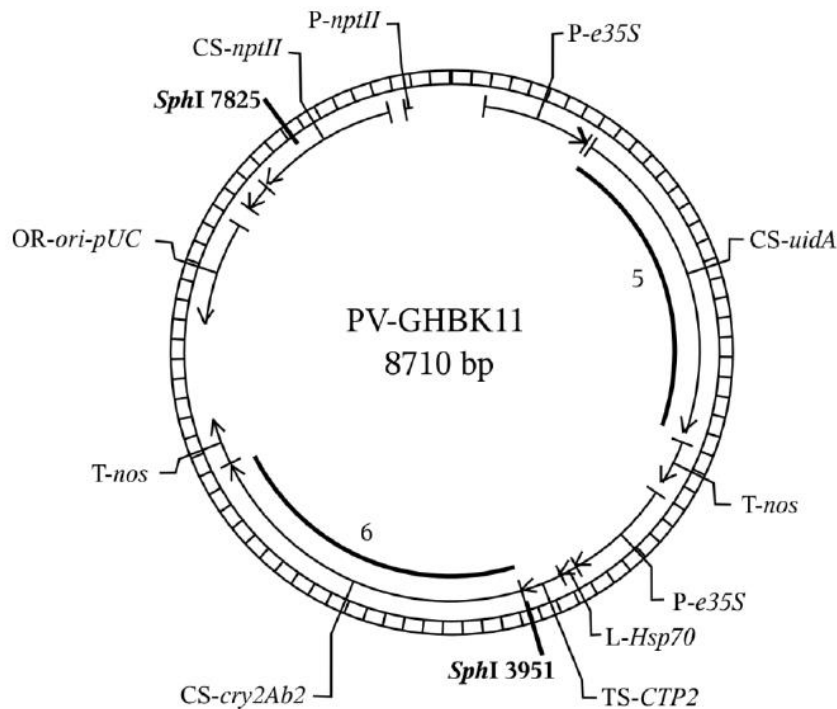


Figura 4. Mapa del vector PV-GHBK11.

Evento COT102 (Propiedad de Syngenta y Licenciado a Monsanto).

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1, utilizando los siguientes cassettes de expresión dentro de los bordes izquierdo y derecho de la región del ADN-T (la región designada para ser transferida e integrada al genoma de la planta de algodón):

1. Secuencia codificante del gen *aph4*, derivado de *E. coli*, que codifica el marcador selectivo enzima APH4; la expresión *in planta* del gen *aph4* es regulada corriente arriba por el promotor más el primer Intrón del gen *ubiquitina-3* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS 3 (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*).
2. Secuencia codificante del gen *vip3Aa19*, un gen sintético diseñado para alojar el sesgo de codones de maíz y codificando una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la proteína nativa Vip3A de *B. thuringiensis*, con la excepción de una sola sustitución de una lisina por una glutamina en la posición 284. La expresión *in planta* del gen *vip3Aa19*

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

se regula corriente arriba por la región promotora (promotor más elementos asociados haciendo un total de 1,407 pb) del gen *actina-2* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa). Syngenta declara que el promotor confiere expresión constitutiva del gen *vip3Aa19*.

La transformación del tejido de hipocótilos de algodón se realizó mediante incubación del tejido de la planta con células de *A. tumefaciens* cepa GV3101. Esta cepa porta dos plásmidos vectores separados, el vector pCOT-1 y un plásmido accesorio desarmado, pMP90. El plásmido accesorio proveyó los genes de virulencia necesarios para transferir el ADN-T del plásmido pCOT-1. Como el plásmido pMP90 no contenía ni genes inductores de tumores ni bordes de ADN-T, no se espera que su ADN se transfiriera al genoma del algodón. Después de la incubación con las células de *A. tumefaciens*, el tejido de hipocótilos se pasó a un medio sintético, conteniendo el agente de selección higromicina B. Las células de algodón transformadas, expresando la proteína APH4, sobrevivieron la selección y subsecuentemente se generaron plantas.

Además de los elementos genéticos mencionados arriba, ambos vectores contienen secuencias fuera de la región del ADN-T que son necesarias para la selección y mantenimiento de los vectores en los hospederos bacterianos adecuados. Syngenta resumió los resultados del análisis de hibridación Southern blot del ADN genómico usado para evaluar el evento insertado. Basados en esos análisis, Syngenta declara que el evento COT102 contiene un inserto con una copia sencilla de los cassettes de expresión de los genes *vip3Aa19* y *aph4*, sin encontrarse transferencia de secuencias fuera del ADN-T. Además, se resumió la clonación, amplificación y secuenciación del evento insertado. Syngenta declara que no se encontraron marcos de lectura abierta (ORFs, Open Reading Frames, en idioma inglés) en las secuencias de ADN genómico que flanquean el sitio de inserción y que la secuencia del transgén insertado en el evento COT102 y en el plásmido pCOT1 son idénticos (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica Evento COT102 FDA 2005**).

Para información más detallada consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

Evento Bollgard®II (MON 15985) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 15985 fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* de *B. thuringiensis* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), que contiene los genes *cry1Ac* y *nptII*, mediante bombardeo de partículas o biobalística. El plásmido utilizado para la transformación fue PV-GHBK11 (Figura 4), que contiene los cassettes de los genes *cry2Ab* y *uidA*. El plásmido se propagó en

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

E. coli y se purificó de suspensiones bacterianas usando una columna de purificación. En las Tablas 3 y 4 se muestran resúmenes de los componentes genéticos de los plásmidos PV-GHBK04 y PV-GHBK11, utilizados para obtener el algodón MON 531 y MON 15985, respectivamente.

El ADN insertado en el algodón MON 15985 se caracterizó por medio de técnicas moleculares tradicionales. Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de inserciones (número de *loci* de integración en el genoma del algodón), el número de copias (número de transgenes en un *locus* individual), la integridad de las regiones codificantes de *cry2Ab* y *uidA*, la integridad de los cassettes de *cry2Ab* y *uidA*, y para confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Se utilizaron las secuencias del plásmido PV-GHBK11, el esqueleto del plásmido, las regiones codificantes *cry2Ab* y *uidA*, el promotor potenciado 35S CaMV y la secuencia de poliadenilación NOS 3'. Adicionalmente, se verificaron las regiones de unión 5' y 3' entre el inserto y el ADN de la planta mediante PCR.

Los datos muestran que el algodón MON 15985 contiene una inserción de ADN del fragmento lineal del plásmido PV-GHBK11. El inserto contiene una copia de cada cassette de expresión, *cry2Ab* y *uidA*. Este evento no contiene secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Por lo tanto, se concluye que en el evento MON 15985, se deben producir las proteínas Cry2Ab y GUS de tamaño normal, como resultado de la integración del segmento de ADN derivado del plásmido PV-GHBK11.

El evento MON 15985, que posee la característica de resistencia al ataque de insectos lepidópteros plaga objetivo, se produjo mediante la tecnología de aceleración de partículas utilizando un segmento de ADN del plásmido PV-GHBK11, digerido con la enzima *KpnI* conteniendo los cassettes de expresión *cry2Ab* y *uidA*. El único inserto en MON 15985 se localiza en un segmento *Scal* de 9.3 Kb. Este inserto contiene una copia completa del cassette *cry2Ab* ligado a una copia del cassette *uidA*.

El gen de interés y el gen marcador se purificaron del esqueleto del vector cortando con la endonucleasa de restricción *KpnI* (Ausubel *et al.*, 1987) y subsecuentemente fueron separados y purificados en base a diferencia de tamaño mediante el método de HPLC (High Performance Liquid Chromatography, en idioma inglés). Este fragmento lineal se designó PV-GHBK11L y después de purificarlo se precipitó sobre partículas de oro usando cloruro de calcio y espermidina como lo describió John (1997). El ADN se introdujo en los meristemos del algodón y se detectó su integración mediante tinción histoquímica de la proteína GUS en tejido vascular. El tejido no transformado se removió a través del tiempo, promoviendo entonces el crecimiento de meristemos conteniendo el ADN introducido. Las semillas resultantes de estas plantas fueron analizadas para la producción de la proteína Cry2Ab (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 88913 se desarrolló vía transformación con *A. tumefaciens* de la variedad de algodón Coker 312, para insertar un constructo con doble copia del gen *cp4 epsps* que codifica la enzima CP4 EPSPS. Esta proteína le confiere la característica de tolerancia a los herbicidas no selectivos de la familia Faena® (ingrediente activo glifosato). En este evento, que contiene un inserto único, las características de la inserción y de las secuencias flanqueantes están conservadas. Aparte de tolerancia al herbicida, conferida por el evento MON 88913, no hay diferencias biológicamente significativas entre el algodón MON 88913 y su contraparte convencional.

Para la transformación se utilizó el vector binario PV-GHGT35 (Figura 5), que contiene dos cassettes de expresión del gen *cp4 epsps* en tándem de 8.2 Kb. A partir del borde derecho, la primera secuencia codificante está regulada por un promotor transcripcional quimérico P-FMV/TSF1, las secuencias líder L-TSF1 e intrón I-TSF1, un péptido de tránsito al cloroplasto (*ctp2*) y la secuencia terminadora de la transcripción *E9*. La segunda secuencia codificante está regulada por un promotor transcripcional quimérico P-35S/ACT8, las secuencias líder L-Act8 e intrón I-Act8 y las mismas secuencias del péptido de tránsito y terminador que las utilizadas en el primer cassette (Tabla 5). La secuencia del gen *cp4 epsps* usada para producir MON 88913 es la misma que la que contiene el algodón Solución Faena® (MON 1445). El ADN genómico del algodón MON 88913 se digirió con enzimas de restricción y fue sujeto a análisis de hibridación Southern blot para caracterizar el ADN que se integró en el genoma del algodón.

Se realizaron análisis moleculares para caracterizar el ADN integrado en el evento MON 88913. Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de insertos de ADN (número de sitios de integración dentro del genoma del algodón), número de copias (número de copias de un mismo inserto), la integridad de los cassettes del gen *cp4 epsps*, y para establecer la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido en el genoma de la planta.

Los datos muestran que el evento MON 88913 contiene una copia del inserto de ADN en un *locus* de integración individual en un fragmento de restricción *Spe I*, que contiene dos cassettes de expresión intactos del gen *cp4 epsps*. No se detectaron elementos adicionales del vector de transformación PV-GHGT35 (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

Existe poca probabilidad de recombinación en el inserto de MON 88913, por lo tanto, también poca probabilidad de cambios en las características moleculares del inserto (número de insertos, número de copias de los genes, ausencia de secuencias adicionales e integridad del inserto individual).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

En este evento, que contiene un inserto único, las características de la inserción y de las secuencias flanqueantes están conservadas. Aparte de la tolerancia al herbicida, conferida por la inserción del evento MON 88913, no hay diferencias biológicamente significativas entre el algodón MON 88913 y su contraparte convencional.

Tabla 3. Resumen de los elementos genéticos contenidos en el plásmido vector PV-GHBK04 utilizado para la obtención del algodón Bollgard® (MON 531).

Elemento genético	Tamaño (kb)	Origen/Función
Borde derecho (BD)	0.09	Secuencia de ADN derivada del plásmido pTiT37 de <i>Agrobacterium</i> que contiene la secuencia de 24 pb del borde derecho (BD) que inicia el evento de transferencia del T-ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a la planta (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983).
7S 3'	0.43	Región 3' no traducida de la subunidad alfa del gen de la beta-conglicinina de la soya (<i>Glycine max</i> L.), el cual controla la terminación transcripcional y dirige la poliadenilación del mRNA del gen <i>cy1Ac</i> (Schuler <i>et al.</i> , 1982).
<i>cry1Ac</i>	3.5	Gen de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> que codifica una variante sintética para la proteína Cry1Ac que confiere resistencia a insectos lepidópteros en plantas. Esta proteína es esencialmente idéntica a la proteína de <i>B.t.k.</i> descrita por Adang <i>et al.</i> (1985).
P-E35S	0.62	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciadora duplicada usado para dirigir la expresión de la región codificante del gen <i>cry1Ac</i> (Kay <i>et al.</i> , 1987).
<i>aad</i>	0.79	Promotor bacteriano y secuencia codificante para la enzima 3'(9)-O-nucleotidiltransferasa derivada del transposón Tn7 que confiere resistencia bacteriana a los antibióticos espectinomina y estreptomina (Fling <i>et al.</i> , 1985).
NOS 3'	0.26	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (<i>nos</i>) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> el cual controla la terminación transcripcional y dirige la poliadenilación del mRNA del gen <i>nptII</i> (Fraleley <i>et al.</i> , 1983; Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983).
<i>nptII</i>	0.79	Gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II derivado del transposón Tn5 de <i>Escherichia coli</i> (Beck <i>et al.</i> , 1982). La expresión de este gen en plantas confiere resistencia al antibiótico kanamicina y sirve marcador de selección (Fraleley <i>et al.</i> , 1983).
<i>Ori-V</i>	0.62	Origen de replicación para <i>Agrobacterium</i> derivado del plásmido de amplio rango de hospedantes RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981).
<i>Ori-322/rop</i>	1.8	Origen de replicación derivado del plásmido pBR322 para replicación del plásmido PV-GHBK04 en <i>Escherichia coli</i> (Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Sutcliffe, 1978).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 4. Resumen de los elementos genéticos presentes en el plásmido vector PV-GHBK11 utilizado en la obtención del algodón Bollgard®II (MON 15985).

Elemento genético	Rango (pares de bases)	Función (Referencia)
P-e35S	183-797	El promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985) con una región potenciadora duplicada utilizada para dirigir la expresión del gen <i>uidA</i> .
Secuencia intermedia	798-828	Secuencia intermedia de unión.
uidA	829-2637	El gen <i>uidA</i> del plásmido pUC19 de <i>E. coli</i> , codificando la proteína β -D-glucuronidasa (GUS) (Glissen <i>et al.</i> , 1998).
Secuencia intermedia	2,638-2,692	Secuencia intermedia de unión.
Terminador NOS 3'	2,693-2,948	La región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia intermedia	2,949-3,013	Secuencia intermedia de unión.
P-e35S	3,014-3,627	El promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985) con una región potenciadora duplicada utilizada para dirigir la expresión del gen <i>cry2Ab</i> .
Secuencia líder de la proteína PetHSP70	3,628-3,727	Secuencia líder no traducida del gen de la proteína de shock térmico 70 de la petunia.
AEPSPS/CTP2	3,728-3,959	La secuencia N-terminal del péptido de tránsito al cloroplasto del gen EPSPS de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Secuencia intermedia	3,960-3,965	Secuencia intermedia de unión.
cry2Ab	3,966-5,873	El gen <i>cry2Ab</i> basado en la secuencia proveniente de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Widner y Whiteley, 1990).
Secuencia intermedia	5,874-5,896	Secuencia intermedia de unión.
Terminador NOS 3'	5,897-6,152	La región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia intermedia	6,153-6,227	Secuencia intermedia de unión.
Esqueleto del plásmido	6,278-158	(Vieira y Messing, 1987).
lacZ	6,278-6,516	Secuencia codificante parcial del gen <i>lacI</i> , el promotor P- <i>lac</i> y una secuencia codificante parcial para la β -D-galactosidasa o proteína <i>lacZ</i> .
ori-pUC	6,661-7,315	Un origen de replicación del plásmido que permite la propagación del ADN en hospederos bacterianos como <i>E. coli</i> .
<i>ntplI</i> (kan)	7,396-8,363	El gen de la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II del transposón Tn5 aislado de <i>Escherichia coli</i> (Beck <i>et al.</i> , 1982). El gen <i>ntplI</i> también contiene una porción de 0.153 kb del gen <i>ble</i> de 0.378 kb de Tn5.
P-kan	8,452-8,501	El promotor para el gen <i>ntplI</i> obtenido de Tn5.
Secuencia intermedia	159-182	Secuencia intermedia de unión.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

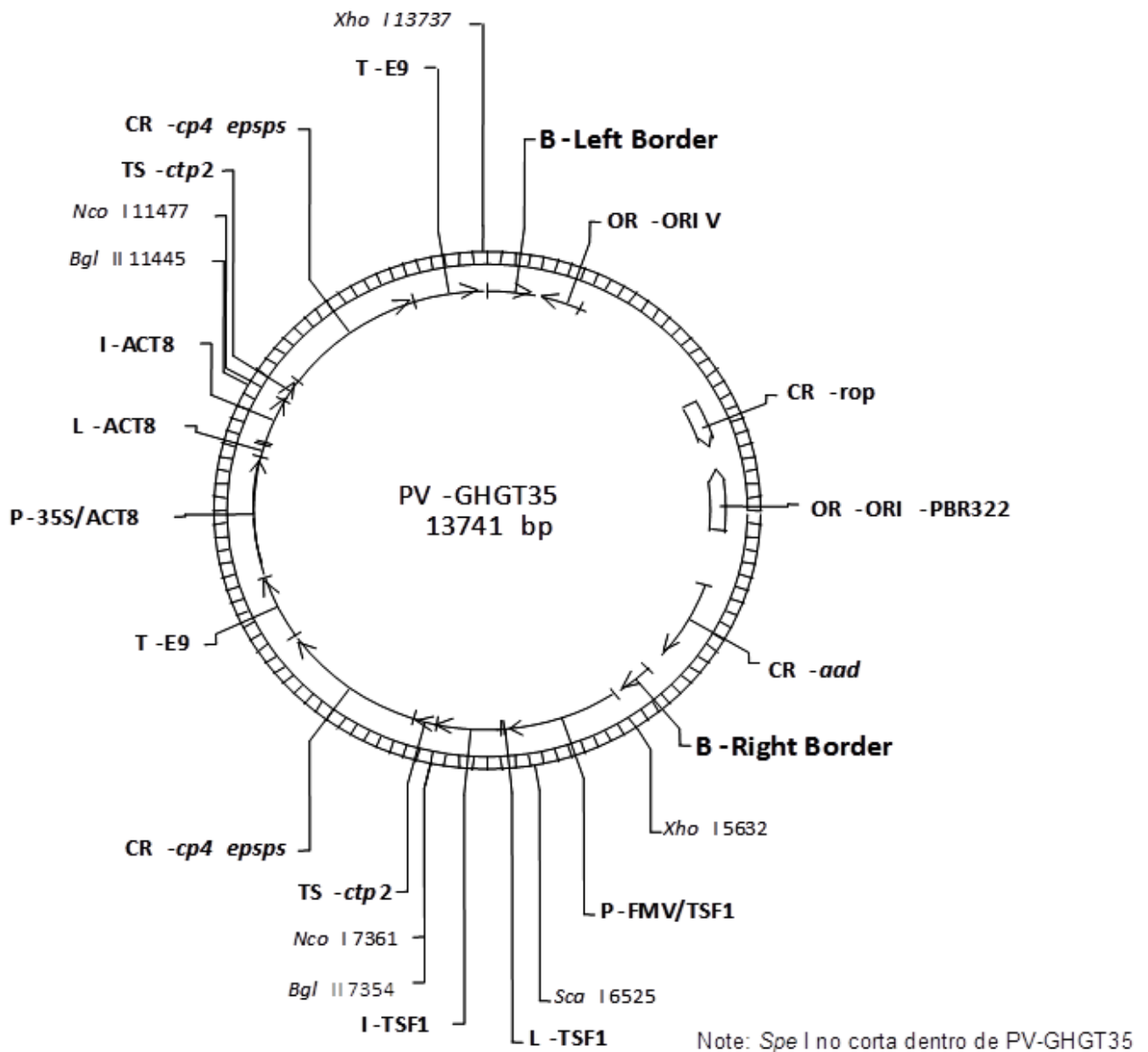


Figura 5. Mapa del plásmido vector PV-GHGT35.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 5. Resumen de elementos genéticos presentes en el plásmido PV-GHGT35 utilizado en la obtención del algodón Solución Faena Flex® (MON 88913).

Elemento genético	Localización en el plásmido	Función (Referencia)
Secuencia intermedia	1 – 8	Secuencia intermedia de unión.
B¹ – Región borde izquierda	9 – 450	Secuencia de ADN derivada de <i>Agrobacterium</i> conteniendo la secuencia del borde izquierdo para la transferencia eficiente del ADN (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia intermedia	451 – 536	Secuencia intermedia de unión.
OR² – ORI V	537 – 1174	Origen de replicación para <i>Agrobacterium</i> derivado plásmido RK2 de amplio rango de hospederos (Stalker <i>et al.</i> , 1981).
Secuencia intermedia	1,175 – 2,329	Secuencia intermedia de unión.
CR³ – rop	2,330 – 2,802	Secuencia codificante para la proteína represora de oligonucleótidos para mantenimiento del número de copias del plásmido en <i>E. coli</i> (Giza y Huang, 1989).
Secuencia intermedia	2,803 – 3,050	Secuencia intermedia de unión.
OR – ORI – PBR322	3,051 – 3,679	Origen de replicación de pBR322 para mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i> (Sutcliffe, 1978).
Secuencia intermedia	3,680 – 4,221	Secuencia intermedia de unión.
CR – aad	4,222 – 5,010	Secuencia codificante para la adenililtransferasa Tn7 que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomina (Fling <i>et al.</i> , 1985).
Secuencia intermedia	5,011 – 5,204	Secuencia intermedia de unión.
B – Región borde derecha	5,205 – 5,535	Secuencia de ADN derivada de <i>Agrobacterium</i> conteniendo la secuencia del borde derecho para la transferencia eficiente del ADN (Depicker <i>et al.</i> , 1982).
Secuencia intermedia	5,536 – 5,645	Secuencia intermedia de unión.
P⁴ – FMV/TSF1	5,646 – 6,685	Promotor quimérico conteniendo el promotor del gen <i>tsf1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que codifica el factor de elongación EF-1 alfa (Axelos <i>et al.</i> , 1989) y secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus del mosaico de la <i>Scrophularia</i> (Richins <i>et al.</i> , 1987)
L⁵ – TSF1	6,686 – 6,731	Secuencia líder (exón 1) del gen <i>tsf1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica el factor de elongación EF-1 alfa (Axelos <i>et al.</i> , 1989).
I⁶ – TSF1	6,732 – 7,353	Intrón del gen <i>tsf1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica el factor de elongación EF-1 alfa (Axelos <i>et al.</i> , 1989).
Secuencia intermedia	7,354 – 7,362	Secuencia intermedia de unión.

¹B – Borde²OR – Origen de replicación³CR – Región codificante⁴P - Promotor⁵L – Secuencia líder⁶I - Intrón

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

Monsanto desarrolló el algodón MON 88701, tolerante a los herbicidas dicamba y glufosinato, que permite aplicaciones de dicamba sobre el cultivo para controlar malezas de hoja ancha desde la preemergencia hasta siete días previos a la cosecha y de glufosinato desde la emergencia hasta la floración temprana para un amplio espectro de control de malezas. El evento MON 88701 provee una ventana de aplicación de dicamba más amplia, más allá de sus usos actuales de presembrado, y la aplicación de glufosinato a dosis y tiempos equivalentes a los utilizados en el algodón tolerante a glufosinato comercial actual. La combinación de estos dos modos de acción herbicida únicos provee un sistema de manejo de malezas efectivo para la producción de algodón. El herbicida dicamba provee control efectivo sobre más de 95 especies de maleza anual y bianual y supresión de más de 100 especies de malezas perennes y leñosas. El glufosinato, que es un herbicida de contacto de amplio espectro, provee control no selectivo de aproximadamente 120 malezas de hoja ancha y zacates.

Se caracterizó el inserto de ADN en el evento MON 88701 por medio de un análisis de hibridación Southern blot, PCR y análisis de secuencia de ADN. Los resultados de esta caracterización demuestran que MON 88701 contiene una copia de los cassettes de expresión de los genes *dmo* y *bar*, no contiene secuencias del esqueleto del plásmido, el ADN de transferencia (ADN-T) se encuentra integrado de manera estable en un *locus* individual y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos a través de múltiples generaciones. Los elementos genéticos presentes en el algodón MON 88701 se muestran en la Tabla 6. Estas conclusiones se basaron en varias evidencias:

- 1) Se analizó por Southern blot todo el genoma del algodón para identificar la presencia del ADN-T y la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997, y se demostró que se insertó solo una copia del ADN-T en un solo sitio de inserción y que el inserto se hereda establemente;
- 2) Se realizaron análisis de secuencia para determinar la secuencia exacta del ADN insertado y las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto, permitiendo la comparación de la secuencia del ADN-T en el plásmido vector para confirmar que sólo las secuencias esperadas se integraron;
- 3) Se compararon las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional para identificar cualquier rearrreglo que pudiera ocurrir en el sitio de inserción durante la transformación. En conjunto, la caracterización de la modificación genética demuestra que una sola copia del ADN-T se integró establemente en un solo *locus* del genoma del algodón y que no hay secuencias del esqueleto del plásmido presentes en el algodón MON 88701.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 6. Resumen de elementos genéticos presentes en el plásmido PV-GHHT6997 utilizado en la obtención del algodón DGT (MON 88701).

Elemento genético	Localización en el plásmido	Función (Referencia)
Extremo 5'	1 – 1126	ADN genómico del algodón.
Secuencia intermedia	1,127 – 1,219	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
P¹-PC1SV	1,120 – 1,652	Promotor del transcrito de longitud completa de la mancha clorótica del caulimovirus del cacahuate (<i>PC1SV</i>) que dirige la transcripción en células vegetales (Maiti y Shepherd, 1998).
Secuencia intermedia	1,653 – 1,658	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
L²-TEV	1,659 – 1,790	Secuencia líder 5' no traducida del ARN del virus del mosaico del tabaco (VMT) (Niepel y Gallie, 1999) involucrado en la regulación de la expresión de genes.
Secuencia intermedia	1,791 – 1,791	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
TS³-CTP2	1,792 – 2,019	Secuencia blanco del gen ShkG de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica la región del péptido de tránsito de EPSPS que dirige el transporte de la proteína al cloroplasto (Herrmann, 1995; Klee <i>et al.</i> , 1987).
CS⁴-dmo	2,020 – 3,042	Secuencia codificante para la proteína dicamba mono-oxigenasa (DMO) de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> que confiere tolerancia a dicamba (Herman <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 1997).
Secuencia intermedia	3,043 – 3,096	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
T⁵-E6	3,097 – 3,411	Secuencia 3' no traducida del gen <i>E6</i> de <i>Gossypium barbadense</i> (algodón) que codifica una proteína fibrosa involucrada en el desarrollo temprano de la fibra (John, 1996) que dirige la poliadenilación de ARNm.
Secuencia intermedia	3,412 – 3,423	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
P-e35S	3,424 – 4,035	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985) conteniendo la región potenciadora duplicada (Kay <i>et al.</i> , 1987) que dirige la transcripción en células vegetales.
Secuencia intermedia	4,036 – 4,038	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
L-Hsp70	4,039 – 4,134	Secuencia líder 5' no traducida del gen <i>DnaK</i> de <i>Petunia hybrida</i> que codifica la proteína de shock térmico 70 (<i>HSP70</i>) (Rensing y Maier, 1994; Winter <i>et al.</i> , 1988) involucrada en la regulación de la expresión de genes.
Secuencia intermedia	4,135 – 4,140	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
CS-bar	4,141 – 4,692	Secuencia codificante de la proteína fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT) de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> que confiere la tolerancia al glufosinato (Thompson <i>et al.</i> , 1987).
Secuencia intermedia	4,693 – 4,697	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
T-nos	4,698 – 4,950	Secuencia 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (<i>nos</i>) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi codificando NOS que dirige la poliadenilación (Bevan <i>et al.</i> , 1983; Fraley <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia intermedia	4,951 – 4,969	Secuencia accesoria para clonación del ADN.
B⁶-Región Borde Izquierda^{r1}	4,970 – 5,231	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> conteniendo la secuencia borde izquierdo utilizada para transferir el T-ADN (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Extremo 3'	5,232 – 6,369	ADN genómico del algodón.

¹P – Promotor.²L – Secuencia líder.³TS – Secuencia diana.⁴CS – Secuencia codificante.⁵T – Secuencia de terminación de la transcripción.⁶B – Borde.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de copias y de sitios de inserción del ADN integrado, así como la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. La estrategia del Southern blot fue diseñada para asegurar que todos los segmentos transgénicos potenciales se identificaran. Todo el genoma del algodón fue analizado utilizando sondas que abarcaban todo el plásmido vector para detectar la presencia del inserto, así como confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. Esto se logró usando sondas de no más de 2.5 Kb de largo para asegurar un alto nivel de sensibilidad del ensayo. Esto se demostró mediante la detección de un control positivo añadido a 0.1 copias de genomas equivalentes. Se escogieron específicamente dos sets de enzimas de restricción para caracterizar por completo el ADN-T y detectar cualquier fragmento potencial de ADN-T y secuencias del esqueleto del plásmido. Las enzimas de restricción fueron escogidas de manera que cada enzima corta una vez dentro del ADN-T insertado, y por lo menos una vez dentro del ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto. Como consecuencia, por lo menos un segmento conteniendo una porción del inserto con el ADN 5' flanqueante adyacente generado por un set de las enzimas es de tamaño predecible y se sobrepone con otro segmento de tamaño predecible conteniendo una porción del inserto con el ADN 3' flanqueante adyacente generado por otro set de enzimas. Este diseño de dos sets de enzimas asegura que el inserto completo se identifique en un patrón de hibridación predecible. Esta estrategia también maximiza la posibilidad de detectar una inserción en otro lugar del genoma que podría ser pasado por alto si esa banda co-migrara en el gel con una banda esperada.

Para determinar el número de copias y sitios de inserción del ADN-T, y la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido, se corrieron muestras por duplicado con la misma cantidad de ADN digerido en un gel de agarosa. Un set de muestras se corrió por un periodo de tiempo mayor (corrida larga) que el segundo set (corrida corta). La corrida larga permite mayor resolución de ADN de alto peso molecular, mientras que la corrida corta permite retener el ADN de bajo peso molecular en el gel. Estos análisis determinaron que se insertó una sola copia del ADN-T en un solo *locus* de integración en el genoma del algodón y que no se detectaron elementos adicionales incluyendo secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997 en el algodón MON 88701.

Los análisis de PCR y de secuencia de ADN complementan los análisis de hibridación Southern blot. Se realizaron estos análisis adicionales para determinar la secuencia completa de ADN del inserto y secuencias de ADN flanqueantes en el algodón MON 88701, confirmaron la organización predicha de los elementos genéticos dentro del inserto, y determinaron las secuencias flanqueando el inserto. Adicionalmente, los análisis de secuencia confirmaron que cada elemento genético (excepto por las regiones borde) en el inserto está intacta y que la secuencia del inserto es idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido PV-GHHT6997 (Figuras 6 y 7). Más aún, la organización genómica del inserto MON 88701 se determinó

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

comparando la secuencia flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional.

La estabilidad del ADN-T presente en el algodón MON 88701 a través de múltiples generaciones se demostró por análisis Southern blot. Se digirió ADN de cinco generaciones de algodón MON 88701 con uno de los sets de enzimas utilizadas para el análisis de número de insertos y número de copias, y se hibridó con dos sondas que detectan segmentos de restricción que incluyen el inserto completo. La estrategia de análisis de identificación consiste en dos segmentos del inserto cada uno conteniendo su ADN genómico adyacente que evalúa no solo la estabilidad del inserto, sino también la estabilidad del ADN directamente adyacente al inserto.

Los análisis de segregación se realizaron para determinar la herencia y estabilidad del ADN-T en el algodón MON 88701. Los resultados de estos análisis demuestran que la herencia y estabilidad del inserto es como se esperaba a través de generaciones múltiples, lo que corrobora la estabilidad molecular del inserto y establece el comportamiento genético del ADN-T en un solo *locus* del cromosoma.

Los análisis de hibridación Southern blot confirmaron que el ADN-T reportado representa el único inserto detectable en el evento MON 88701. En la Figura 8, se presenta un mapa circular del vector plásmido PV-GHHT6997 (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

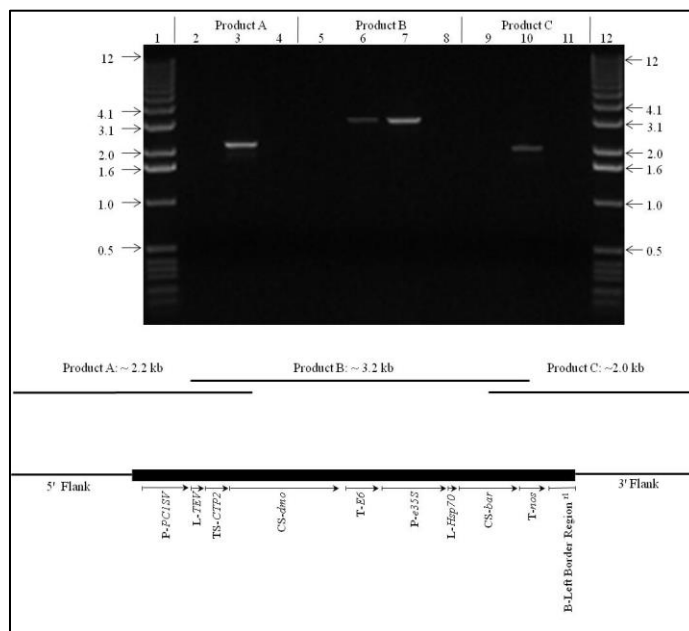


Figura 6. Análisis de PCR sobrepuesta a través del inserto en el evento DGT® (MON 88701).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

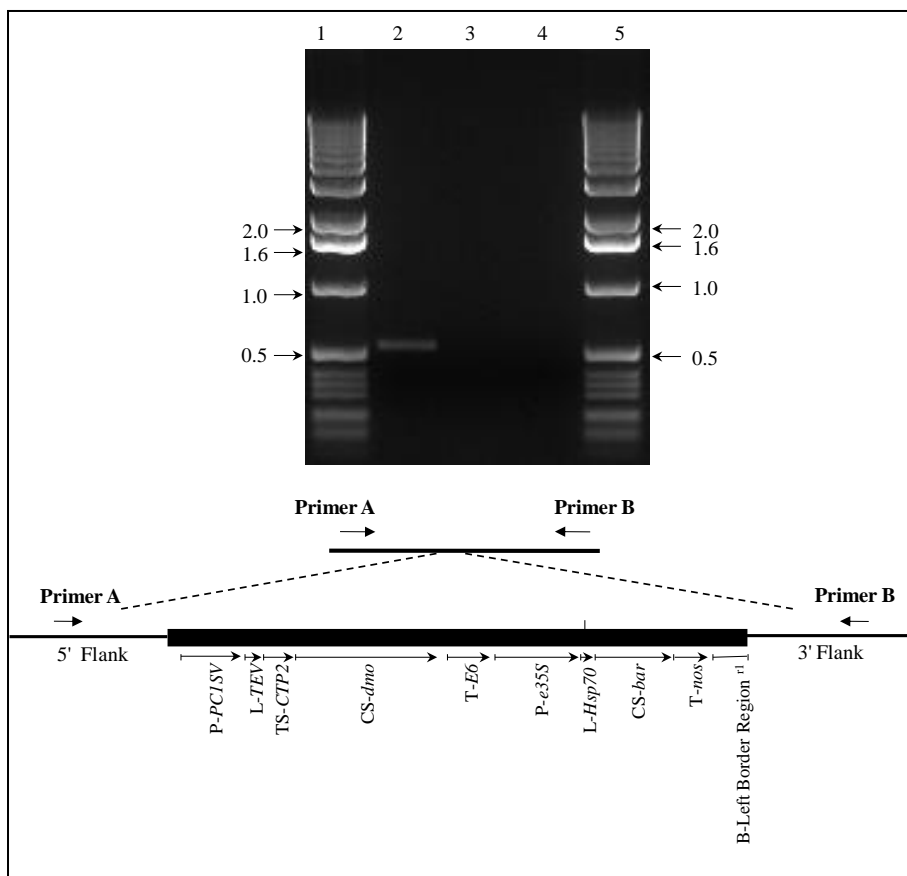


Figura 7. Amplificación por PCR del sitio de inserción del evento DGT® (MON 88701) en el control convencional.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

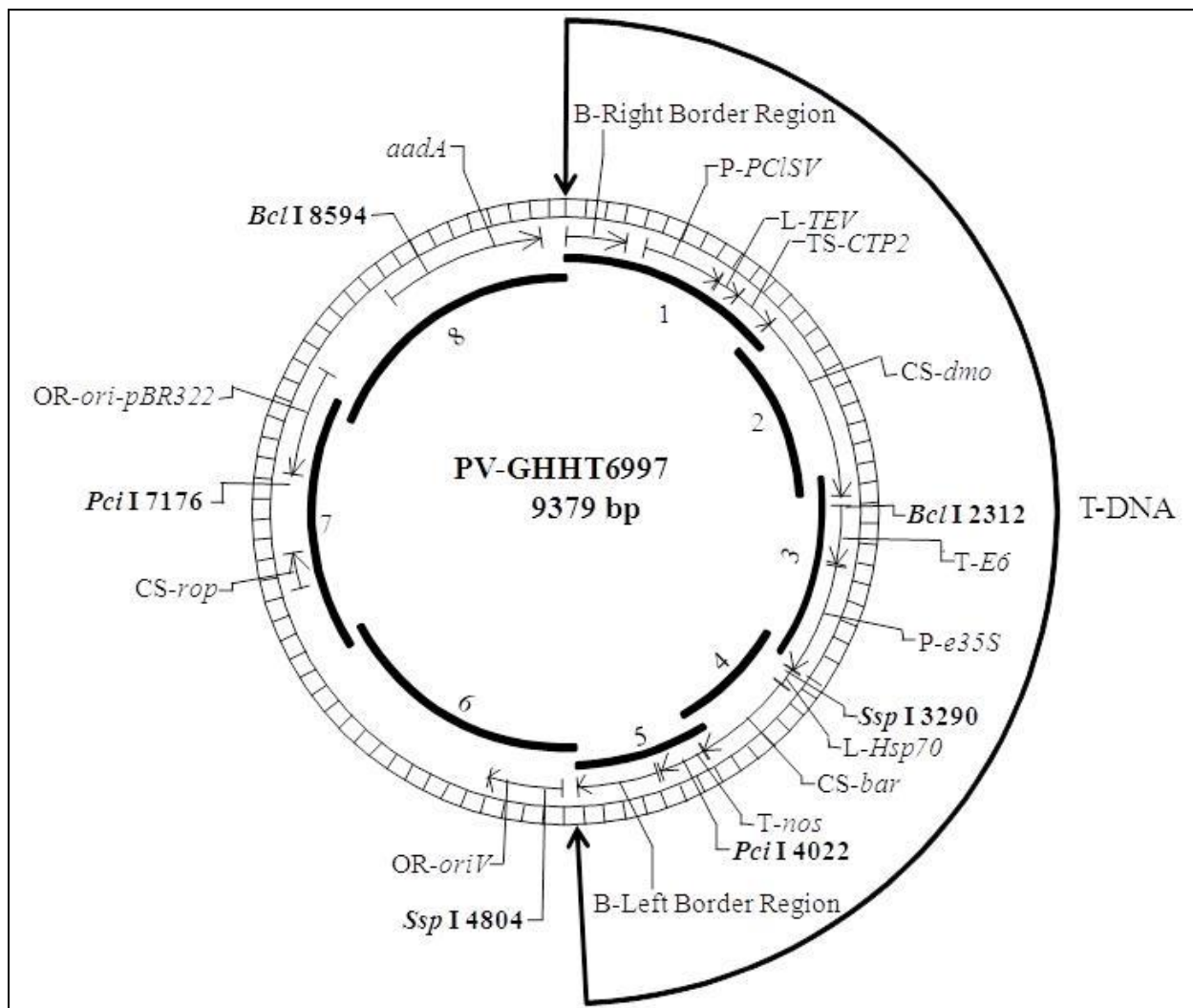


Figura 8. Mapa circular del vector PV-GHHT6997.

Confirmación de la presencia e integridad de los eventos individuales en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard®III [que es un evento apilado por cruce mendeliano que se compone de los eventos Bollgard®II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex® (MON 88913) y DGT® (MON 88701).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Se realizó un estudio para confirmar la presencia e integridad de los insertos y secuencias de ADN flanqueante de los insertos MON 88702, MON 15985, MON 531, MON 88701 y MON 88913 en el producto apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Esto mediante la comparación de estas secuencias con las secuencias previamente determinadas para cada evento individual.

Se generaron productos de PCR superpuestos que abarcan el inserto y las secuencias de ADN flanqueantes 3' y 5' de cada inserto individual que compone el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Para esto se utilizó ADN extraído de semilla de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 mediante el método CTAB y se cuantificó utilizando un fluorómetro.

Para MON 88702, se generaron los productos de PCR A (~4.3 kb) y B (~4.3 kb) (Figura 9). Para MON 15985, los productos de PCR C (~6.4 kb) y D (~2.2 kb) (Figura 10). Para MON 531, los productos de PCR F (~4.1 kb) y G (~6.5 kb), que abarcan el inserto y las secuencias de ADN flanqueante 3' del inserto funcional de MON 531; y se amplificó un tercer producto de PCR E (~2.5 kb), que abarca el flanco 5' y la secuencia parcial del gen *cry1Ac* (Figura 11). Para MON 88701 se generaron los productos de PCR H (~2.9 kb) e I (~4.4 kb) (Figura 12); y para MON 88913, los productos de PCR J (~7.0 kb) y K (~4.6 kb) (Figura 13).

Estos productos fueron separados en geles de agarosa al 1% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio para verificar que fueran del tamaño esperado. Después de ser purificados fueron secuenciados con la plataforma MiSeq (Illumina Inc.) que produce lecturas de secuencia cortas (~150 pb). Se obtuvo el número de lecturas de secuencia suficientes para asegurar la cobertura completa de los productos de PCR.

Las secuencias consenso para cada inserto individual se generaron compilando lecturas de secuencia obtenidas de los productos de PCR superpuestos de cada evento. Cada secuencia consenso se alineó con las secuencias previamente reportadas para los eventos individuales MON 88702, MON 15985, MON 531, MON 88701 y MON 88913 (Garnaat *et al.*, 2017; Doherty *et al.*, 2001; Pineda *et al.*, 2002; Reiser *et al.*, 2001; Arackal *et al.*, 2011; Groat *et al.*, 2010) para confirmar la presencia e integridad de los insertos individuales y sus secuencias flanqueantes en el apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Los insertos y secuencias de ADN genómico flanqueantes de los insertos MON 88702, MON 15985, MON 531, MON 88701 y MON 88913 en MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 son idénticas a las secuencias reportadas para los eventos individuales MON 88702, MON 15985, MON 531, MON 88701 y MON 88913.

Estos datos demuestran que los insertos MON 88702, MON 15985, MON 531, MON 88701 y MON 88913 y ADN flanqueante están presentes e intactos en el producto apilado de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

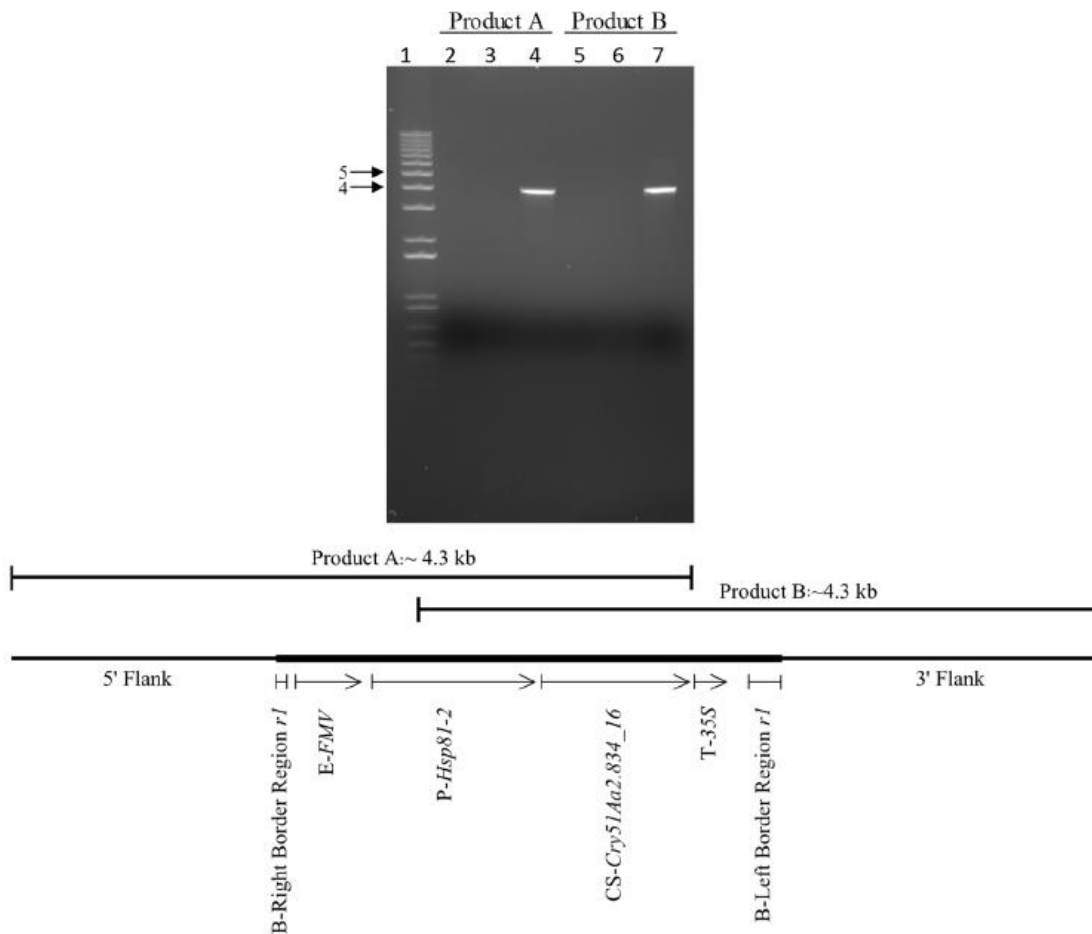


Figura 9. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 88702 en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Carril

- 1 Marcador de Peso Molecular.
- 2 Control negativo sin ADN.
- 3 Control convencional.
- 4 MON 88702.

Carril

- 5 Control negativo sin ADN.
- 6 Control convencional.
- 7 MON 88702.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

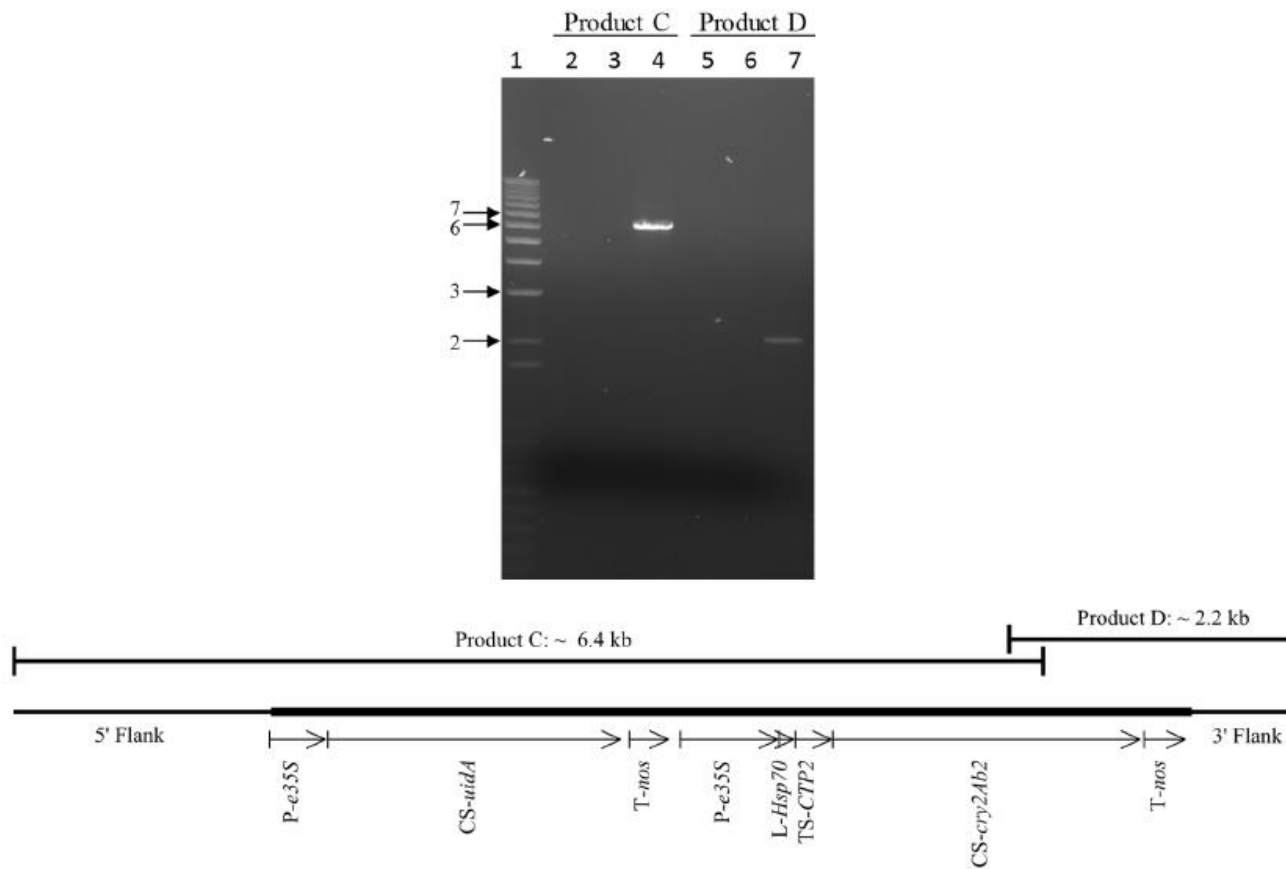


Figura 10. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 15985 en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Carriles:

- 1 Marcador de Peso Molecular.
- 2 Control negativo sin ADN.
- 3 Control convencional.
- 4 MON 15985.
- 5 Control negativo sin ADN.
- 6 Control convencional.
- 7 MON 15985.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

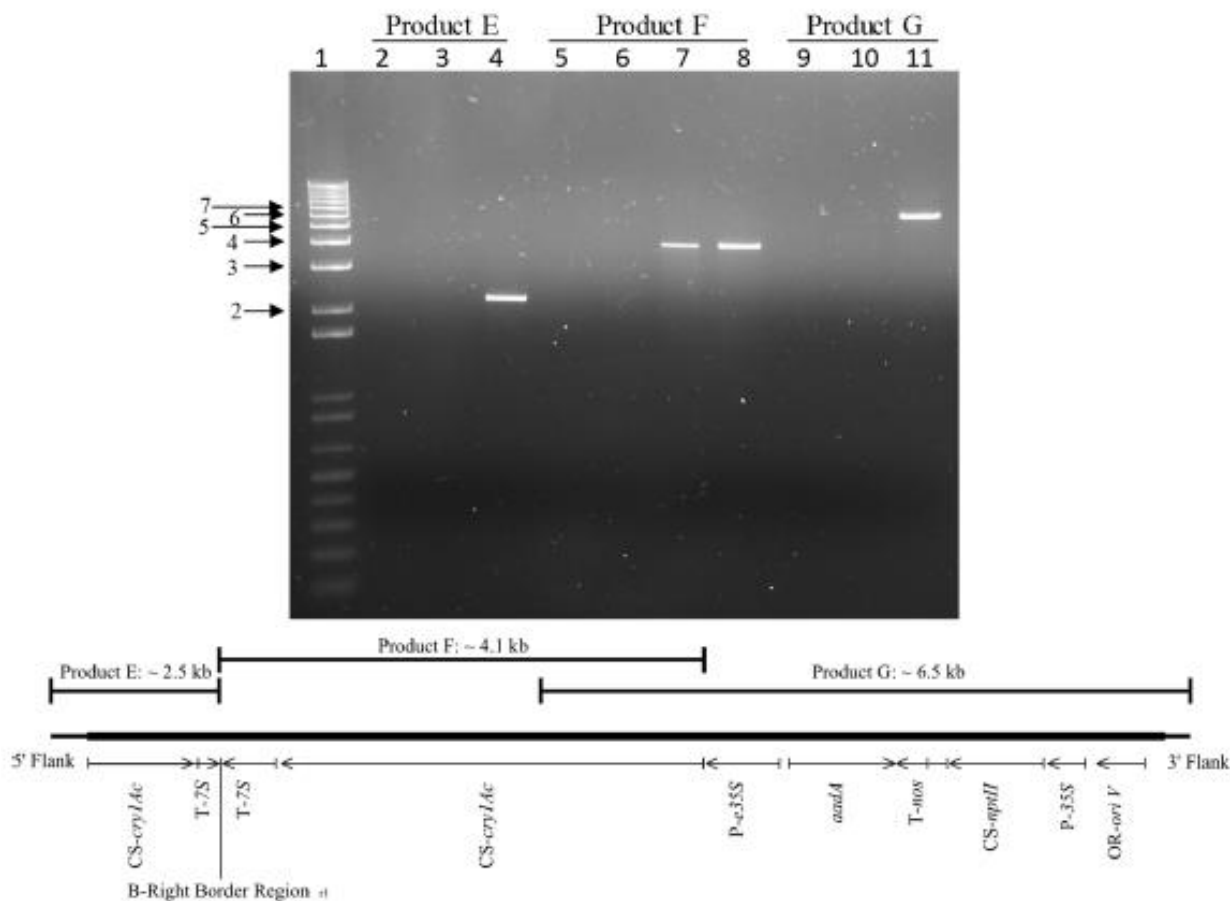


Figura 11. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 531 en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Carriles:

- 1 Marcador de Peso Molecular.
- 2 Control negativo sin ADN.
- 3 Control convencional.
- 4 MON 531.
- 5 Control negativo sin ADN.
- 6 Control convencional.
- 7 PV-GHBK04 (Plásmido utilizado para generar el evento MON 531).
- 8 MON 531.
- 9 Control negativo sin ADN.
- 10 Control convencional.
- 11 MON 531.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

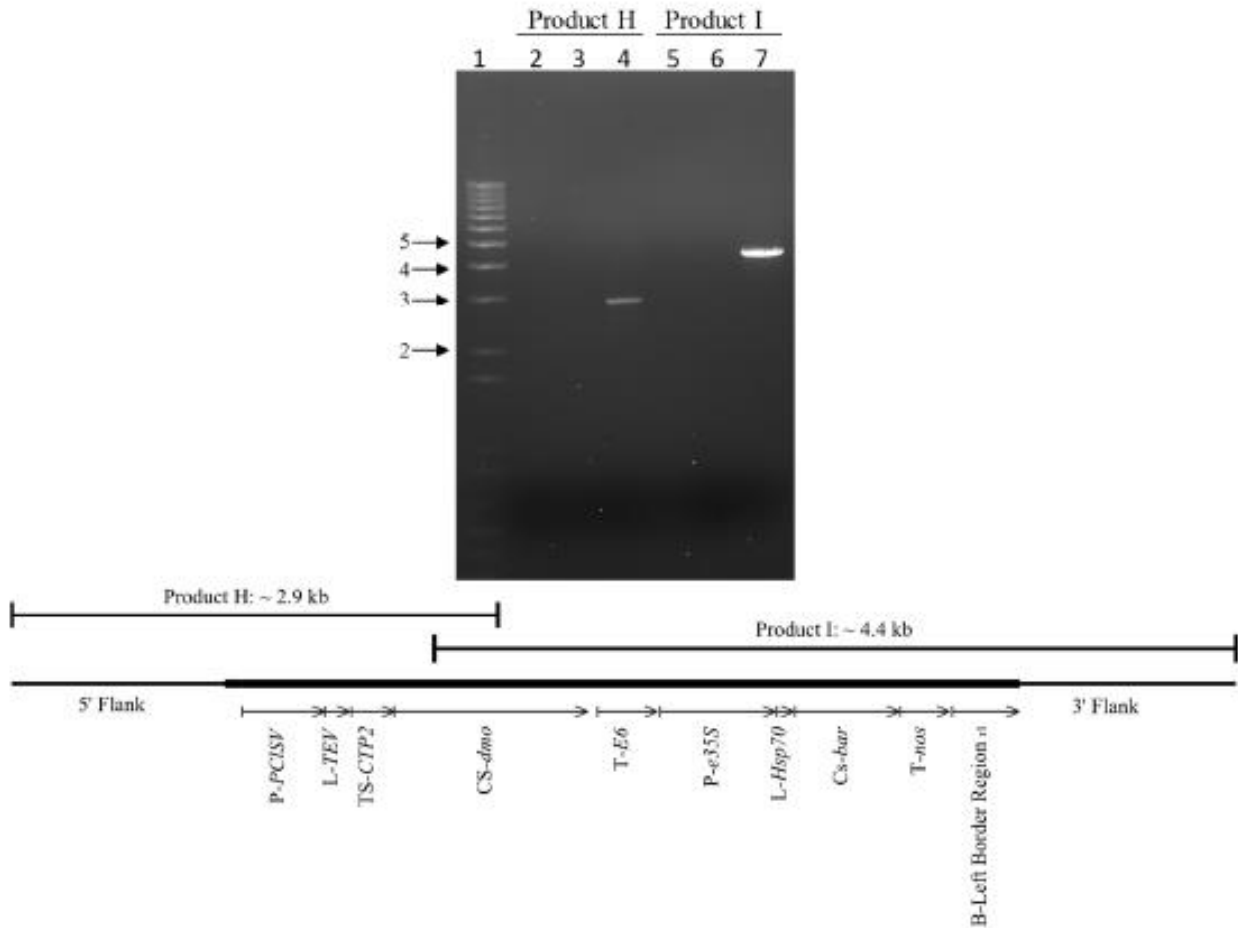


Figura 12. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 88701 en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Carriles:

- 1 Marcador de Peso Molecular.
- 2 Control negativo sin ADN.
- 3 Control convencional.
- 4 MON 88701.
- 5 Control negativo sin ADN.
- 6 Control convencional.
- 7 MON 88701.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

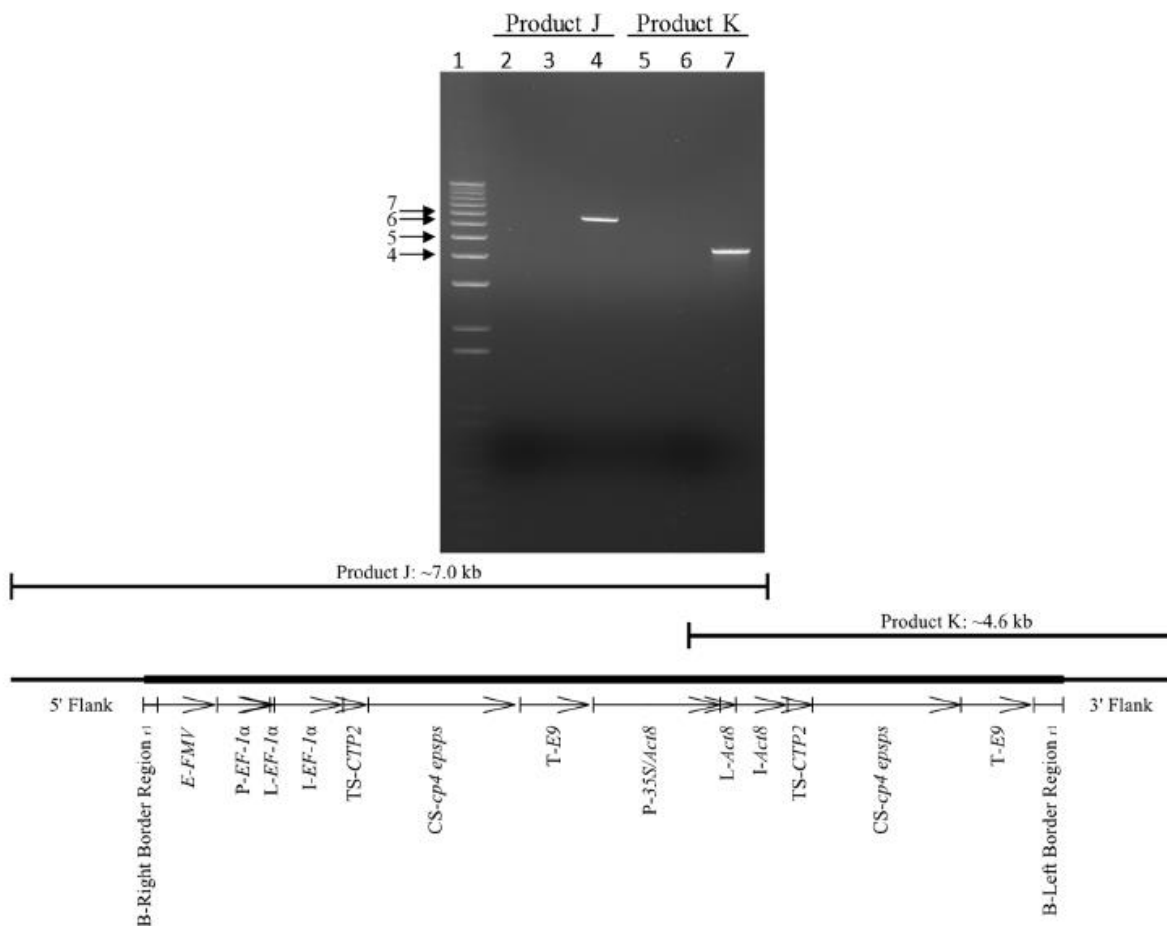


Figura 13. Análisis de productos de PCR superpuestos del inserto MON 88913 en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Carriles:

1 Marcador de Peso Molecular.

2 Control negativo sin ADN.

3 Control convencional.

4 MON 88913.

5 Control negativo sin ADN.

6 Control convencional.

7 MON 88913.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas de los eventos individuales comprendidos en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se muestran en las Tablas 1–6. Las representaciones esquemáticas de los vectores utilizados para transferir los insertos en los eventos individuales se presentan en las Figuras 1-5 y 8, y las representaciones esquemáticas lineales se presentan en las Figuras 9-14 (**ANEXO 11. MSL0029106 Análisis de Secuencia de eventos individuales en evento apilado**).

Para información más detallada sobre los componentes individuales, fuente y función de las secuencias del evento COT102 contenidas en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto y la Figura 14.

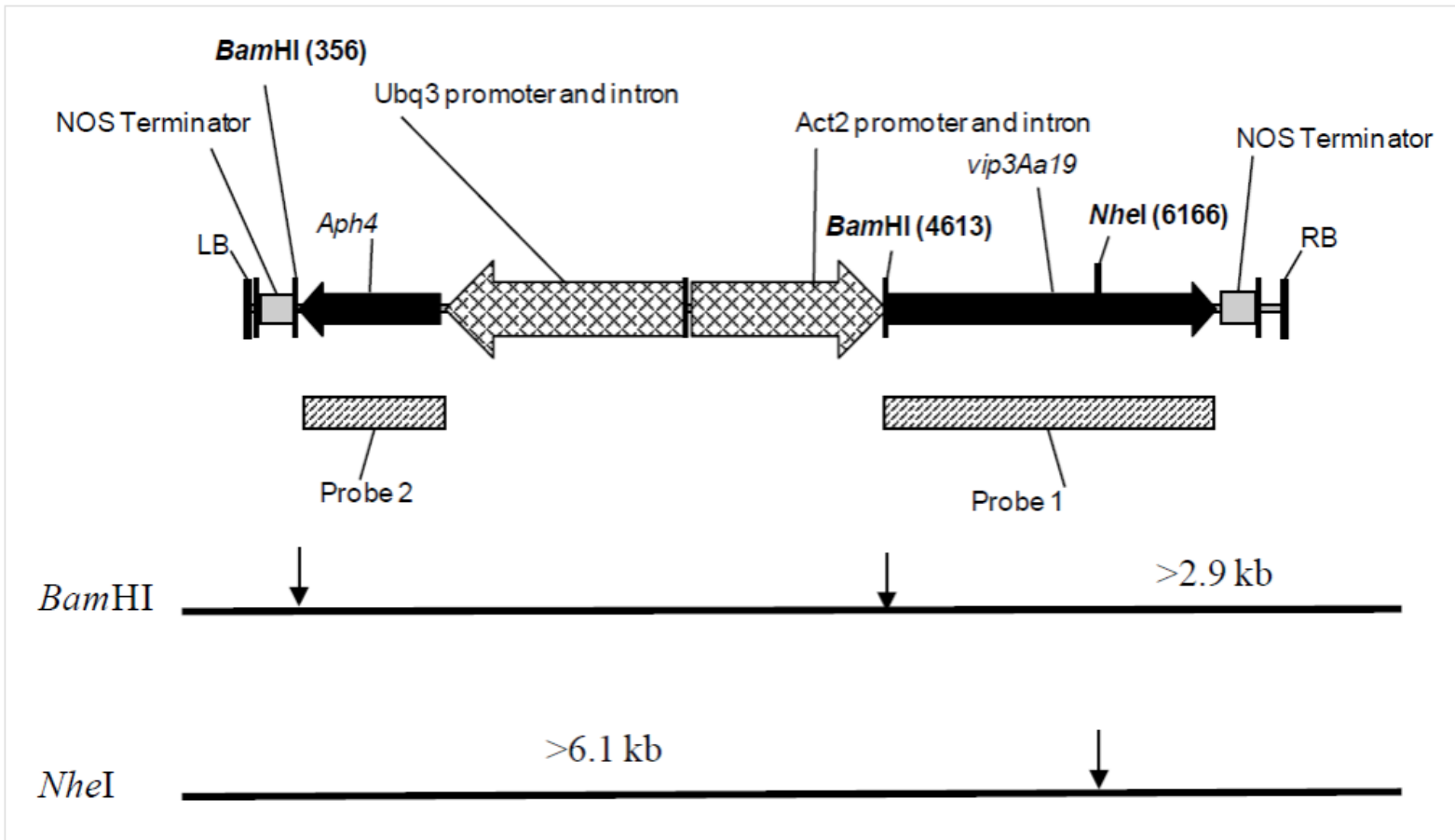


Figura 14. Representación esquemática del inserto de ADN en el evento COT102.

Mapa lineal del inserto de ADN en el evento COT102. Los elementos genéticos contenidos en el inserto están identificados en este mapa lineal, así como los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el análisis de hibridación Southern blot con posiciones relativas al primer par de bases de la secuencia de ADN. Se indican los tamaños y localización de las sondas 1 y 2 y los tamaños esperados de los fragmentos de restricción.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

I.a. Identificador único del evento de transformación de organismos internacionales de los que México se parte, cuando exista.

El identificador único del evento es **MON-887Ø2-4 × MON-15985-7 × SYN-IR1Ø2-7 × MON-887Ø1-3 × MON-88913-8**.

El nombre común utilizado para fines prácticos en este documento es MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

I.b. Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México

Las especies pertenecientes al género *Gossypium* originarias de México que han sido reportadas en la literatura son las siguientes (Fryxell, 1984; Palomo, 1996):

G. aridum (Rose y Standley) Skovsted, está distribuida en las costas de Veracruz, Puebla, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Colima y Sinaloa. Posee hojas enteras, lo cual la coloca entre las especies más antiguas. La flor es de color rosáceo con centro de color rojo-oscuro. La cápsula (bellota o fruto) es alargada con cuatro celdas (lóculos) que contienen numerosas semillas de 4 a 6 mm de largo. La fibra que cubre la semilla es muy corta y de color café. Es la única especie diploide de México que se localiza en las costas del Océano Atlántico y cuenta con genes que confieren resistencia a las enfermedades conocidas como viruela del algodón (*Puccinia cacabata* A&H), y secadera tardía (*Verticillium dahliae* K.). Esta especie es caducifolia y florea cuando no presenta hojas, se desarrolla en pendientes y suelos delgados y pedregosos.

G. armourianum Kearney, se localiza en la costa del Golfo de Baja California Sur y en la Isla de San Marcos. Especie caducifolia; posee hojas enteras ovadas, su flor es de color amarillo con centro de color rojo y la cápsula es ovoide con tres o cuatro lóculos. Cada lóculo contiene de una a tres semillas de 8 mm de longitud. La fibra es muy corta y de color café. Es altamente resistente a la sequía y tiene brácteas caducas, las cuales son una característica deseable en algodones cultivados, ya que se tendría una cosecha más limpia y una mejor calidad. Habita en pendientes fuertes y suelos muy delgados y peligrosos.

G. davidsonii Kellogg, se localiza en las costas del sur de Sonora y Baja California Sur y en las Islas de Revillagigedo. Esta especie es de interés desde el punto de vista evolutivo del género *Gossypium*, ya que tiene hojas enteras ovadas y es difícil de cruzar con otras especies. La evolución del género es en el sentido de pasar de formas con hojas enteras hacia formas con

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

hojas partidas (lobuladas), por tal razón, es posible que *G. davidsonii* sea la especie más ancestral que surgió en las primeras fases de la evolución de este género. La flor es de color amarillo con una pequeña mancha de color rojo en el interior, su cápsula es ovoide y generalmente, tiene cuatro lóculos. La semilla mide 6 mm de largo y tiene fibra corta y escasa. Esta especie se caracteriza por contar con una alta pubescencia en sus órganos vegetativos, lo que le da resistencia al ataque de plagas (insectos chupadores).

G. gossypoides (Ulbnich) Standley, es una especie originaria de Oaxaca y Sinaloa. Posee hojas trilobuladas con lóbulos más o menos pronunciados. La flor es de color rosa con una mancha de color rojo en el interior. La cápsula tiene tres lóculos y la semilla mide 7 mm de largo y está rodeada por fibras cortas y grisáceas. Habita en la selva baja caducifolia, en pendientes y suelos planos arcillosos.

G. harknessii Brandegee, se localiza en Baja California Sur y en la isla del Carmen. Especie caducifolia; sus hojas son enteras algo lobuladas y más anchas que largas. La flor es de color amarillo con base interior de color rojo y la cápsula es ovoide con tres a cuatro lóculos. Las semillas miden de 8 a 10 mm de largo con fibras grisáceas muy pequeñas y fuertemente adheridas. Al igual que *G. armourianum*, es muy resistente a la sequía y tiene brácteas caducas. Es una especie muy importante ya que aportó los genes de esterilidad genético-citoplásmica y los genes restauradores de la fertilidad que hicieron posible la formación de genotipos híbridos de algodón con propósitos comerciales. Habita en pendientes fuertes y suelos muy delgados y pedregosos.

G. laxum Phillips, se encuentra en el cañón del Zopilote del Estado de Guerrero. Las hojas presentan de tres a cinco lóbulos muy pronunciados y son caducas. La flor es de color rosa, con la mitad inferior de la parte interior de color rojo-oscuro. Las cápsulas son ovoides y poseen de tres a cinco lóculos. Cada lóculo contiene varias semillas de 6 a 8 mm de largo. Tiene un alto contenido de fibra con una longitud de 6 a 8 mm. La característica de hoja caduca es muy importante ya que se puede incorporar en las variedades cultivadas para evitar el uso de defoliantes y levantar una cosecha más limpia y de mejor calidad (libre de residuos de hojas). Habita en las selvas bajas caducifolias, en pendientes con suelos delgados, arenosos, pedregosos y pobres.

G. lobatum Gentry, se localiza en el Estado de Michoacán. Son árboles; posee hojas tri- o pentalobuladas y más anchas que largas. La flor es de color púrpura claro y con un color morado fuerte en la mitad inferior del interior de la misma. Las cápsulas tienen tres lóculos. Cada lóculo contiene varias semillas muy pubescentes, la fibra es muy corta y de color blanco o café claro. Al igual que *G. laxum*, cuenta con hojas caducas. Habita en las selvas bajas caducifolias, en lugares secos con pendientes y suelos pedregosos y delgados.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

G. thurberi Todaro, se encuentra en Arizona, en el norte de la Península de Baja California Sur, Sonora y oeste de Chihuahua. Son plantas con altura hasta de 2.5 m; la hoja es glabra y presenta de tres a cinco lóbulos angostos y largos, bien definidos. La flor es de color crema o ligeramente amarilla, con una base interior de color rojo o sin él. La cápsula es glabra de forma semirredonda a oblonga con tres lóculos. Cada lóculo contiene de seis a ocho semillas con una longitud de 3 a 4 mm y casi glabras. Esta especie soporta temperaturas de -7°C, característica deseable en las formas cultivadas para conferirles resistencia a bajas temperaturas. Al cruzarla con variedades cultivadas, incrementa la resistencia de la fibra.

G. trilobum (Mocino y Sessé) Skovsted, se localiza en Michoacán, Morelos, Puebla y Sinaloa. Posee hojas con tres lóbulos bien definidos en las inflorescencias. La flor es ligeramente amarilla con el centro de color rojo. La cápsula es glabra con tres (raramente dos) lóculos y de forma oblonga. Cada lóculo contiene de ocho a 10 semillas, cuya longitud es de 3 a 4 mm. Las pubescencias de la semilla son muy pequeñas y ligeramente amarillentas.

G. turneri Fryxell, se localiza en la costa de Sonora, cerca de la bahía de San Carlos. La hoja es someramente trilobulada, entera, con casi el mismo largo y ancho, y caduca. La flor es de un color amarillo brillante y presenta una pequeña mancha rojiza en la base. La cápsula tiene de tres a cinco lóculos y es de forma redonda a ovoide. La semilla mide de 7 a 8 mm de longitud y está cubierta por pubescencias (fibra) muy cortas.

G. schwendimanii Fryxell y Koch, son de las últimas reportadas (1987) y se les localizó en Michoacán. Son árboles de 4 a 5 m de altura.

G. lanceolatum Todaro, se localiza en Oaxaca, Guerrero, Michoacán y Nayarit. Las hojas pueden ser de cinco, tres, o de un solo lóbulo y en todos los casos, los lóbulos son largos y estrechos. La flor es de color amarillo y con, o sin, centro de color rojo. La cápsula es de forma semirredonda y contiene tres lóculos con varias semillas. La semilla está rodeada por fibra larga de color blanco.

G. hirsutum Linneo, se encuentra en los Estados del sur y sureste de México. Las hojas son de tres o cinco lóbulos ovalados o triangulados. La flor es de color crema o ligeramente amarilla con, o sin, mancha rojiza en el centro. Las cápsulas son de forma ovalada o semirredonda y tienen de tres a cinco lóculos. Cada lóculo contiene varias semillas cubiertas con fibra larga de color blanco, café claro o café oscuro.

El algodón cultivado (*G. hirsutum*) tiene cuatro parientes tetraploides que comparten el mismo genoma y podrían formar progenie híbrida viable. Sin embargo, tres de estas especies (*G. darwinii*, *G. mustelinum* y *G. tomentosum*) están geográficamente aisladas de México y de la producción de algodón y por esta razón es altamente improbable que se crucen con *G. hirsutum*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

La hibridación entre los tetraploides *G. hirsutum* y *G. barbadense* está limitada por barreras biológicas (diferencias estructurales de cromosomas que causan la eliminación de genes del progenitor y combinaciones de genes que pueden resultar letales). Entonces, el flujo génico desde *G. hirsutum* a las cuatro especies tetraploides relacionadas es limitada y se considera insignificante.

Las cruzas entre cualquiera de las cinco especies tetraploides (*G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. tomentosum*, *G. mustelinum* y *G. darwinii*) y cualquiera de las especies diploides son poco frecuentes y cuando ocurren, la descendencia es estéril a causa de las anomalías meióticas (OECD, 2008). Por ejemplo, los híbridos entre *G. hirsutum* o *G. barbadense* y *G. thurberi* son triploides ($3x=39$) y son completamente masculinos y femeninos estériles (Beasley, 1942).

Las especies de algodones silvestres reportadas para México son diploides ($2n=2x=26$) y, por lo tanto, son sexualmente incompatibles con el algodón cultivado (*G. hirsutum*), el cual es una especie alotetraploide ($2n=4x=52$).

I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles.

Se han reportado 50 especies reconocidas (5 tetraploides y 45 diploides) del género *Gossypium* en el mundo (Tabla 7). A través de extensos esfuerzos de mejoramiento genético convencional, los híbridos obtenidos entre el algodón cultivado, *Gossypium hirsutum* (tetraploide), y las especies diploides del género *Gossypium* son raros y, cuando estos ocurren, los híbridos resultantes son estériles. Por lo tanto, la transferencia génica de *G. hirsutum* a cualquiera de las 45 especies diploides de algodón en la naturaleza es muy poco probable.

G. hirsutum tiene cuatro parientes tetraploides que comparten el mismo genoma y podrían formar prole híbrida viable. Sin embargo, tres de estas especies (*G. darwinii*, *G. mustelinum* y *G. tomentosum*) están geográficamente aisladas de México y de la producción comercial de algodón y, por esta razón, es altamente improbable que se crucen con *G. hirsutum*. La hibridación entre *G. hirsutum* y *G. barbadense* está limitada por barreras biológicas (diferencias estructurales de cromosomas que causan la eliminación de genes del progenitor y combinaciones de genes que pueden resultar letales). Entonces, el flujo génico desde *G. hirsutum* a las cuatro especies tetraploides relacionadas es limitada y se considera insignificante.

Las formas cultivadas de *G. hirsutum* fueron domesticadas a partir de una forma silvestre tetraploide que crece entre la vegetación costera del litoral, y a través de selección humana se ha adaptado a hábitats tierra adentro. La selección humana también ha impulsado cambios en varias características incluyendo reducción en dormancia, hábito de crecimiento vertical y aumento en el índice fibra:semilla (incremento en porcentaje de fibra).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El flujo génico de algodón biotecnológico a formas silvestres costeras de *G. hirsutum* es raro porque las formas silvestres ocupan un nicho ecológico en áreas costeras arenosas y no están asociados con la acción humana o áreas perturbadas, lo que las aísla del algodón cultivado (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014).

El algodón biotecnológico se ha sembrado en México desde 1996 y no existen reportes de daño al ambiente. Ninguno de los algodones silvestres o cultivados se consideran malezas o invasivos y, si una característica biotecnológica se transfiriera a *G. hirsutum* feral, no se espera que causara un daño ecológico o impactos ambientales adversos.

Se realizó una búsqueda en la base de datos de CONABIO (SEMARNAT) para identificar las especies reproductivamente compatibles con el algodón tetraploide MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (*G. hirsutum*) en la ecorregión *Planicie Costera Tamaulipeca* (Tamaulipas Norte), mediante sistemas de información geográfica. Los resultados de esta búsqueda fueron que:

Se encontraron seis colectas de la especie *G. hirsutum* (tetraploide) en la base de datos de CONABIO (US National Plant Germplasm System). Una colecta se localizó en la localidad de Ladrillera, Municipio de San Fernando, a una distancia de más de 100 Km al predio candidato más cercano (Tamaulipas 5) propuesto para las evaluaciones experimentales de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Las colectas restantes se localizaron en las cercanías de la Laguna Madre al norte del Municipio Soto La Marina, a una distancia aproximada de 165 Km al predio candidato más cercano (Tamaulipas 5) (Figura 15).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

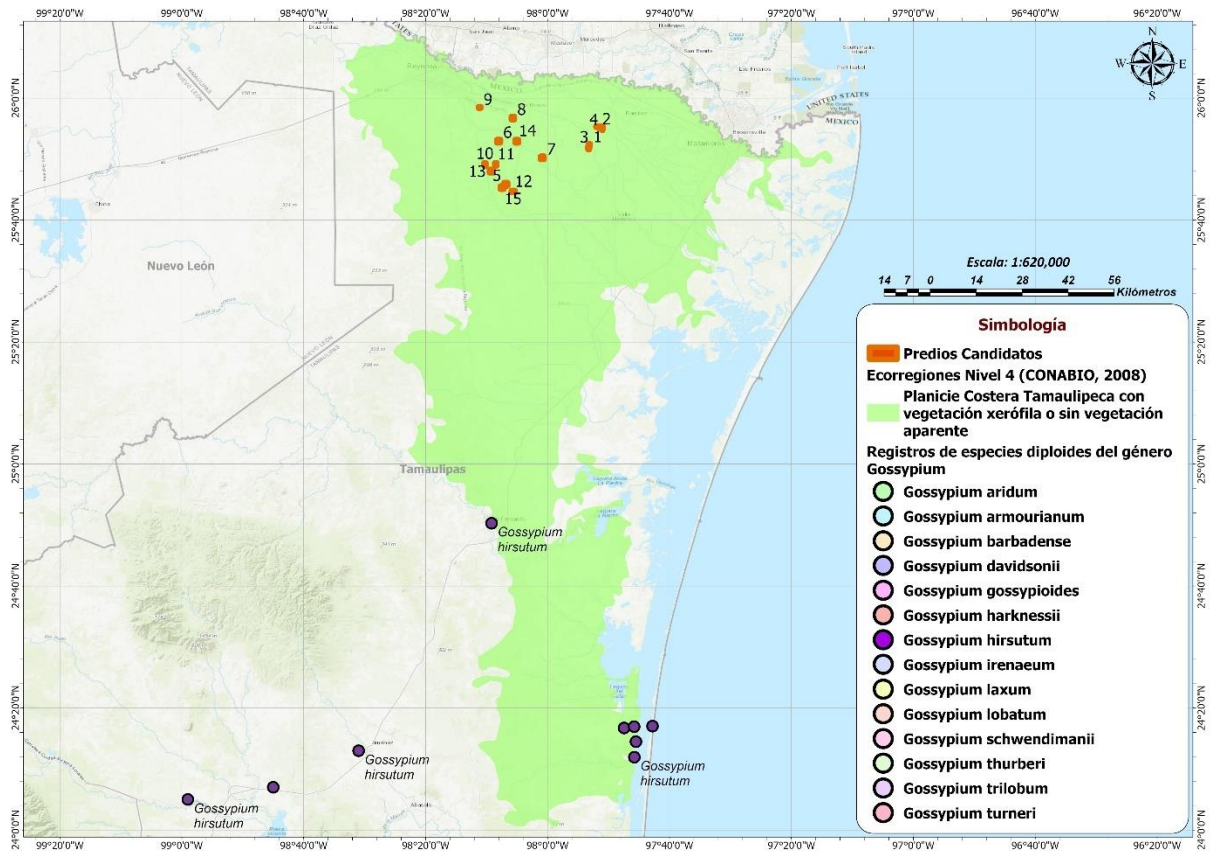


Figura 15. Puntos de colecta de ejemplares de especies silvestres del género *Gossypium* en la ecorregión nivel IV “Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente” en Tamaulipas Norte.

CONABIO. 2023. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010- Distribución conocida, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Datos obtenidos del Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB), registros comprendidos entre los años de 1879 y 2022 (registros no continuos). México. Fuente: <https://www.snib.mx/>.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 7. Especies del género *Gossypium*, designación de genoma y distribución¹.

Espece	Genoma ²	Distribución
<i>G. arboreum</i> L.	A2	Cultígenos asiáticos
<i>G. herbaceum</i> L. subsp. <i>herbaceum</i>	A1-1	Cultígenos NE africano - Asia Central
<i>G. herbaceum</i> subsp. <i>africanum</i> (G. Watt) Vollesen [sinónimo <i>G. herbaceum</i> var. <i>africanum</i> (G. Watt) J.B. Hutch. ex S.C. Harland]	A1-2	sur de África
<i>G. longicalyx</i> J.B. Hutch. & B.J.S. Lee	F1	C-E África
<i>G. triphyllum</i> (Harv.) Hochr.	B2	SO de África
<i>G. anomalum</i> Wawra ex Wawra y Peyr.	B1	SO y N de África subsahariana
<i>G. capitiviridis</i> Mauer	B3	Islas de Cabo Verde
<i>G. trifurcatum</i> Vollesen	?	NE África
<i>G. stocksii</i> Masters	E1	Somalia a Pakistán
<i>G. areysianum</i> Deflers	E3	Arabia
<i>G. incanum</i> (O. Schwartz) Hillcoat	E4	Arabia
<i>G. somalense</i> (Gürke) J.B. Hutch.	E2	NE África
<i>G. benadirensis</i> Mattei	E	NE África
<i>G. bricchettii</i> (Ulbrich) Vollesen	E	NE África
<i>G. vollesenii</i> Fryxell	E	NE África
<i>G. robinsonii</i> F. Muell.	C2	O de Australia
<i>G. sturtianum</i> J.H. Willis var. <i>sturtianum</i>	C1	C a este de Australia
<i>G. sturtianum</i> var. <i>nandewarensis</i> (Derera) Fryxell	C1-n	E Australia
<i>G. bickii</i> Prokh.	G1	N-C Australia
<i>G. australe</i> F. Muell.	G2	NO Australia
<i>G. nelsonii</i> Fryxell	G	N-NE Australia
<i>G. cunninghamii</i> Todaro	K	N Australia
<i>G. anapoides</i> J.M. Stewart, Craven y Wendel, inédito.	K	NO Australia
<i>G. costulatum</i> Todaro	K	NO Australia
<i>G. enthyle</i> Fryxell, Craven y J.M. Stewart	K	NO Australia
<i>G. exiguum</i> Fryxell, Craven y J.M. Stewart	K	NO Australia
<i>G. londonderriense</i> Fryxell, Craven y J.M. Stewart	K	NO Australia
<i>G. marchantii</i> Fryxell, Craven y J.M. Stewart	K	NO Australia
<i>G. nobile</i> Fryxell, Craven y J.M. Stewart	K	NO Australia
<i>G. pilosum</i> Fryxell	K	NO Australia
<i>G. populifolium</i> (Bentham) F. Muell. ex Todaro	K	NO Australia

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Especie	Genoma ²	Distribución
<i>G. pulchellum</i> (C.A. Gardner) Fryxell	K	NO Australia
<i>G. rotundifolium</i> Fryxell, Craven y J.M. Stewart	K	NO Australia
<i>G. gossypoides</i> (Ulbrich) Standley	D6	O México
<i>G. armourianum</i> Kearney	D2-1	NO México (Baja California)
<i>G. harknessii</i> Brandegees	D2-2	NO México (Baja California)
<i>G. turneri</i> Fryxell	D10	NO México
<i>G. laxum</i> L.L. Phillips	D8	CO México
<i>G. aridum</i> (Rose y Standley) Skovsted	D4	NO-SO México
<i>G. lobatum</i> Gentry	D7	CO México
<i>G. schwendimanii</i> Fryxell y S.D. Koch	D11	CO México
<i>G. thurberi</i> Todaro	D1	NO México, Arizona
<i>G. trilobum</i> (Sessé y Moc. ex DC.) Skovsted	D9	O México
<i>G. davidsonii</i> Kellogg	D3-d	NO México (Baja California)
<i>G. klotzschianum</i> Andersson	D3-k	Islas Galápagos
<i>G. raimondii</i> Ulbrich	D5	NO Perú
<i>G. hirsutum</i> L.	(AD)1	Mesoamérica
<i>G. tomentosum</i> Nuttall ex Seemann	(AD)3	Hawái
<i>G. barbadense</i> L.	(AD)2	O Sudamérica
<i>G. darwinii</i> G. Watt	(AD)5	Islas Galápagos
<i>G. mustelinum</i> Miers ex G. Watt	(AD)4	NE Brasil

¹ Fuente (OECD, 2008).² Se han reportado ocho grupos genómicos diploides denominados de la A a la G, más K. En este caso, una única letra designa un genoma diploide y dos letras (AD) un genoma tetraploide.

I.d. Hábitats de persistencia o proliferación.

Ruiz-Corral *et al.* (1999) realizaron una revisión exhaustiva sobre los requerimientos agroecológicos de cultivos de importancia económica para México. Entre otros cultivos, describen las siguientes condiciones climáticas para el desarrollo del algodón reportadas en la literatura científica:

Distribución: El algodón es un cultivo originario de las regiones tropicales de América, África, Asia sudoriental y Australia, su distribución abarca de los 42° Latitud Norte a los 32° Latitud Sur. Este cultivo se adapta a las regiones áridas y semiáridas con climas cálidos y semicálidos.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Su ciclo vegetativo dura alrededor de 135 a 180 días, dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales. El algodón es una planta de tipo fotosintético C₃¹.

Fotoperiodo: El algodón es considerado como una especie de día neutro, aunque algunos cultivares prefieren el día corto.

Altitud: 0-600 m.

Requerimientos hídricos: El algodón requiere entre 700 y 1,300 mm de agua por ciclo de cultivo y se desarrolla en zonas con precipitación anual de 500-1,800 mm. En condiciones de una evapotranspiración de 5 a 6 mm/día, la absorción de agua comienza a reducirse (afectando el rendimiento) cuando el agotamiento del agua del suelo excede del 65%.

Humedad ambiental: Resiste atmósferas secas, siempre que no falte humedad en el suelo.

Temperatura: Temperatura mínima y máxima umbrales de 12.8°C y 30°C, respectivamente. Para apertura de bellotas se requiere por lo menos una temperatura de 15°C. Rango de 10-35°C, óptimo para fotosíntesis de 25-30°C. La temperatura mínima para buenos rendimientos no debe bajar de 18°C y la temperatura del suelo durante la germinación debe ser igual o mayor a 21°C. No responde al termoperíodo y prefiere noches cálidas. Requiere de 27 a 43°C para el desarrollo de bellotas.

Luz: Requiere días soleados, los cuales son especialmente importantes durante la floración. La intensidad de luz óptima es 32.3-86.1 klux.

Requerimientos de suelo.

Textura de suelo: Suelos de migajón a franco-arcilloso y franco limoso, preferentemente no calcáreo.

Profundidad de suelo: Requiere suelos profundos con buen drenaje. Alrededor del 70 al 80% del total del agua absorbida por el cultivo, procede de los primeros 0.9 m de profundidad del suelo, que es donde se encuentra más del 90% del total de raíces.

Salinidad: Es tolerante tanto a la salinidad como a la alcalinidad. Las disminuciones de rendimiento para distintos valores de conductividad eléctrica son los siguientes: 0% para 7.7 mmhos/cm; 10% para 9.6 mmhos/cm; 25% para 13 mmhos/cm; 50% para 17 mmhos/cm y 100% para 27 mmhos/cm.

pH: Su rango de pH va de 4.8 a 7.5, con un óptimo de 5.6.

¹ En las plantas C₃ el CO₂ entra en el ciclo de Calvin y se fija a la RuDP, produciendo dos moléculas de PGA (3 C). Los estomas se abren durante el día.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

I.e. Descripción taxonómica del organismo receptor y donador.

Organismo Receptor

Reino: Plantae – Vegetal

Subreino: Tracheobionta – Plantas vasculares

Superdivisión: Spermatophyta – Plantas con semillas

División: Magnoliophyta – Plantas con flores

Clase: Magnoliopsida – Dicotiledóneas

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Género: *Gossypium*.

Especie: *Gossypium hirsutum* L.

Organismos Donadores

Bacillus thuringiensis

Reino: Eubacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus thuringiensis*

Agrobacterium tumefaciens cepa CP4

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Proteobacteria alfa

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Agrobacterium*

Especie: *Agrobacterium tumefaciens*

Stenotrophomonas maltophilia

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: *Stenotrophomonas*

Especie: *Stenotrophomonas maltophilia*

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Streptomyces hygroscopicus

Reino: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Familia: Streptomycetaceae

Género: *Streptomyces*

Especie: *Streptomyces hygroscopicus*

I.f. País o localidad donde el OGM fue colectado (USA).

Algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × Semilla

MON 88701 × MON 88913

Monsanto Company.

700 Chesterfield Village Parkway North.

St. Louis, Missouri, USA.

Delta & Pine Land Cotton Seed Co.

Scott, Mississippi, 38772, USA.

I.g. Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor.

Las formas silvestres de las especies de algodón tetraploide (*G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. darwinii* y *G. tomentosum*) son plantas costeras, que crecen en playas entre la vegetación litoral o algo alejadas de la playa, pero en la vegetación derivada del litoral. Las formas silvestres de algodón tetraploide crecen en playas y están expuestas al rocío salado del mar. Este algodón primitivo (*G. hirsutum*) es una parte autóctona de la vegetación costera nativa que crece en la costa del norte de la península de Yucatán, y es a menudo la planta dominante en este hábitat. Estas plantas no crecen cerca de las poblaciones humanas (Brubaker y Wendel, 1994; Wendel y Cronn, 2003; Fryxell, 1979).

El algodón silvestre está adaptado a hábitats áridos y cálidos del litoral, mientras que el algodón cultivado incluyendo las razas, se ha adaptado a zonas menos áridas y crece lejos de las costas (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014). En un estudio utilizando modelación de nichos ecológicos (por ejemplo, temperatura y lluvias) y marcadores genéticos, los investigadores demostraron que las plantas de algodón “verdaderamente silvestres” de Yucatán son genética y ecológicamente distintas del algodón feral y cultivado en México (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014). Del modelado de nichos ecológicos identificaron dos regiones donde el algodón “verdaderamente silvestre” puede crecer en México. Estas regiones son la Península de Yucatán y el lado oeste del Golfo de México en parte de la costa

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

de Tamaulipas. El hábitat identificado en Yucatán es relativamente grande y corresponde bien con las poblaciones de algodón silvestre que se han documentado en esta región. El hábitat identificado en la costa de Tamaulipas es marginalmente adecuado para el crecimiento del algodón silvestre y consiste solo en unas áreas pequeñas (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014). No existen colectas de poblaciones identificadas de algodón silvestre *G. hirsutum* en la costa de Tamaulipas (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014) lo que limita el potencial entrecruzamiento entre el algodón GM y el algodón silvestre en esta región.

G. hirsutum silvestre difiere de las formas domesticadas de *G. hirsutum* en varias características (Tablas 8 y 9). Las formas silvestres son extendidas (no en forma vertical con crecimiento lateral prolífico), de crecimiento lento y perennes de vida larga, con pequeñas cápsulas que se abren ampliamente, pequeñas semillas, fibras color café, cortas y escasas y las semillas tienen fibras firmemente adheridas y una testa rígida, lo cual probablemente demora la germinación (Hutchinson, 1951; Rapp *et al.*, 2010).

Durante el proceso de domesticación, la presión de selección humana para ciertas características ha cambiado y las formas ferales han escapado al cultivo durante este proceso (Fryxell, 1979). Algunas de las características que han cambiado del algodón silvestre a las formas de algodón domesticado que comprenden desde el algodón que crece en patios, a veces llamados razas de algodón, y las variedades modernas se enlistan en la Tabla 9. Un carácter morfológico denominado porcentaje de fibra (rendimiento de despepite), que es la proporción del peso de la fibra con respecto al peso de la semilla, se considera que diferencia el algodón silvestre del litoral del algodón que crece en los patios y algodones ferales y cultivados. Esta característica es sumamente variable y oscila aproximadamente del 25 al 40% para algodones cultivados, y el algodón feral y las variedades de patio oscilan del 18 al 20%. El porcentaje de fibras de los algodones silvestres del litoral es de aproximadamente 8 al 10% (Fryxell, 1979). El tamaño del fruto de muchas de las variedades de patio y algodones ferales es pequeño en tamaño y similar a los algodones silvestres del litoral, lo cual sugeriría que los frutos más grandes se seleccionaron después del porcentaje de fibra y probablemente se desarrollaron con prácticas agrícolas más intensivas (Fryxell, 1979). Las fibras de las variedades modernas de algodón son más largas, más densas y más estrechas, lo cual las hace útiles para hilado, mientras que en las variedades silvestres de *G. hirsutum* los tricomas son más cortos, de menor densidad y más gruesos (Rapp *et al.*, 2010), lo que da como resultado una calidad inferior para el hilado (Hutchinson, 1951). En consecuencia, el algodón silvestre es fenotípicamente diferente de las razas y del algodón moderno cultivado (Tablas 8 y 9).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 8. Comparaciones de características de las plantas entre *Gossypium hirsutum*¹ silvestre y domesticado.

Característica	Algodón Silvestre	Algodón Domesticado
Hábitat	En su mayor parte tropical; planta costera	De tropical a templado; distribución amplia; campos cultivados o hábitats modificados por el ser humano
Hábito	Pequeño, arbusto perenne de crecimiento lento, extendido	Erguido
Fruto	Producción de frutos perenne; 15 o más nudos a la primera rama de producción de frutos que limita la floración y producción de frutos de la mayoría de las nuevas plántulas durante la primera temporada; la producción de frutos requiere de días cortos, noches frescas y aumento del estrés causado por sequía (castigo, no regar); establecimiento asincrónico de frutos; tamaño de fruto pequeño con aproximadamente 2 g de semillas y fibra total	Producción de frutos anual; 5 a 7 nudos a la primera rama fructífera que permite el florecimiento de nuevas plántulas y el establecimiento de frutos durante una temporada; la producción de frutos es independiente de la duración del día; prefiere las noches frescas y suficiente humedad del suelo; establecimiento sincrónico de los frutos; tamaño de fruta grande con aproximadamente 6 a 8 g de semillas y fibra total
Tamaño de semilla	Pequeño	Variado
Rendimiento	Bajo	Alto
Fotoperiodo	Sensible	No sensible
Fenología	Patrón marcadamente estacional de crecimiento vegetativo seguido por la producción de frutos y dormancia de la planta	Fase vegetativa corta seguida por superposición en crecimiento vegetativo y producción de frutos y finalmente la fase de "cut-out" y maduración de frutos
Dormancia de las semillas	Presente con germinación esporádica	Ausente, las semillas se embeben en agua y germinan rápidamente
Comparación de células epidérmicas de la semilla	Más cortas, menos densas y más gruesas	Más largas, más densas y más estrechas
Calidad de la fibra	Escasa; porcentaje de fibras (rendimiento de despepite) 8 a 10%	Copiosa; porcentaje de fibra de variedades cultivadas modernas aproximadamente (rendimiento de despepite) 33 a 40% y razas silvestres o tipos de patio, aprox. 18 a 20%
Propiedades de la fibra	Fibra corta y fina; color marrón	Longitud de la fibra variable hasta 28 mm; áspera o fina; con más frecuencia blanca

¹ Información de Hutchinson, 1951; Fryxell, 1979; Lee, 1984; Rapp *et al.* 2010.

Tabla 9. Cambios en la selección de características del algodón por el proceso de domesticación a través del tiempo.¹

Característica	Período de la Historia del Algodón				
	Silvestre	De patio	Posterior a la revolución industrial, previo al despepite del algodón	Posterior al despepite del algodón	Agricultura intensiva moderna
Tegumento	Impermeable	Cualquiera	Cualquiera	Permeable	Permeable
Diferenciación de la pelusa de la fibra	Pobre	Débil	Moderado	Fuerte	Fuerte
Rasgo de semilla en forma de riñón	Indeseable	Deseable	Indeseable	Indeseable	Indeseable
Densidad de la fibra	Baja	Alta	Alta	Alta	Alta
Porcentaje de fibra (rendimiento de despepite)	8 a 10%	18 a 20%	33% o más	33% o más	33% o más
Tamaño del fruto	Pequeño	Pequeño con selección hacia grande	Grande	Grande	Grande con selección hacia pequeño
Productividad	Baja	Baja	Alta	Alta	Muy alta
Hábito de crecimiento	Perenne	Perenne	Cualquiera	Anual	Anual
Capacidad de desprendimiento de la fibra	Difícil	Fácil	Fácil	Fácil	Fácil
Tamaño de semilla	Pequeño	Pequeño a Grande	Grande	Grande	Pequeño
Hábitat	Litoral	Modificado	Cultivado	Cultivado	Cultivado

¹ Tabla de Fryxell, 1979.

² El algodón de patio se cultivó como un arbusto o árbol perenne que produjo fibras de baja calidad para fines no textiles.

Los restos arqueológicos más conocidos de *G. hirsutum* domesticado datan de aproximadamente los años 5,500-4,300 antes del presente (A.P.) en la región central de México. La selección humana de progenitores silvestres ha dado como resultado plantas que, a pesar de ser perennes, son neutrales (no afectadas por la duración del día), e inician la fructificación desde los nódulos bajos, permitiendo su cultivo en forma anual en zonas climáticas templadas (Brubaker *et al.*, 1999; Lee, 1984). La presión de la selección humana también ha aumentado el tamaño de la semilla, creando semillas que germinan fácilmente y se han generado aumentos substanciales en la abundancia y la calidad de la fibra (Brubaker *et al.*, 1999).

El algodón cultivado (*G. hirsutum*) se derivó por la domesticación humana mediante una fuerte selección fenotípica de una variedad silvestre (probablemente relacionada con *G. hirsutum* var. *yucatanense*) que posee tricomas (estructuras en forma de fibras) que son extensiones de la epidermis de la semilla (Fryxell, 1979; Smith, 1995; Hutchinson, 1951). Se cree que estos procesos de domesticación comenzaron aproximadamente hace 5,000 años en la península de Yucatán en México (Rapp *et al.*, 2010), a partir de una planta similar a *G. hirsutum* var. *yucatanense*. A través del proceso de domesticación y selección en diferentes regiones en México se desarrollaron distintas razas.

A través de una serie de recolecciones de germoplasma de aproximadamente hace 60 años en el sur de México y América Central, que distintos autores denominaron razas, variedades y formas nativas, se identificaron en áreas geográficas generales (Hutchinson, 1951; Ulloa *et al.*, 2006). Hutchinson (1951) describió seis razas domesticadas y una raza silvestre de América Central como:

- *morrilli* (*G. hirsutum* var. *morrilli*) zona montañosa interior, meseta mexicana del sur y hacia el norte.
- *palmeri* (*G. hirsutum* var. *palmeri*) cuesta del Pacífico, zona húmeda del sur de México, Istmo de Tehuantepec.
- *richmondi* (*G. de hirsutum* var. *richmondi*) cuesta del Pacífico en la región del Golfo de Tehuantepec.
- *marie-galante* (*G. hirsutum* var. *marie-galante*) norte de América Central (Guatemala), al sur hacia Colombia en ambas costas, región del Caribe (Antillas) y noreste de Brasil.
- *punctatum* (*G. hirsutum* var. *punctatum*) península de Yucatán y hacia el norte sobre la cuesta del Atlántico, hasta La Florida (EE.UU.) y Bahamas.
- *latifolium* (*G. hirsutum* var. *latifolium*), Guatemala (ambas costas) y extremo sur de México (Chiapas) y áreas cercanas.
- *yucatanense* (*G. hirsutum* var. *yucatanense*) raza silvestre o ecotipo confinado a las dunas costeras de la región de Progreso, Yucatán, la cual es una región aislada del continente por pantanos (OECD, 2008; Hutchinson, 1951). Esta ubicación limitaría el flujo de genes del algodón comercial (convencional y derivado de biotecnología) a *G. hirsutum* var. *yucatanense*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El algodón cultivado probablemente fue domesticado a partir del algodón silvestre en el Norte de Yucatán, y a través de la selección por los seres humanos se fue adaptando para el cultivo en hábitats continentales. Durante este proceso, el rango ecológico del algodón cultivado se ha incrementado, pero no incluye los hábitats áridos y calientes donde habita el algodón silvestre. Por lo tanto, el nicho potencial de algodón cultivado está dentro de zonas con áreas de cultivo, y el de las plantas ferales en hábitats limitados cercanas a las áreas de cultivo. Los tipos ferales de algodón crecen en patios, montañas de residuos, al costado de la carretera y otros hábitats modificados por el hombre (Fryxell, 1979; Ulloa *et al.*, 2006) y no se encuentran junto con la vegetación nativa (Fryxell, 1979). Por otra parte, las características de domesticación, como la reducción de la latencia de las semillas, limita al algodón feral la capacidad de recolonizar y persistir en los hábitats adecuados u originales del algodón silvestre (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014). Por lo tanto, el algodón silvestre y el algodón domesticado que ha escapado del cultivo difieren en el hábitat en el que puedan crecer, lo que limita el potencial para la hibridación entre ellos. Otra prueba para apoyar esta rara ocurrencia son las diferencias genéticas entre el algodón domesticado y el algodón silvestre (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014).

La probabilidad de que una característica del algodón biotecnológico se transfiera al algodón silvestre es remota porque no ocurren en el mismo hábitat. Mediante el proceso de domesticación, el algodón cultivado fue adaptado a hábitats continentales (tierra adentro) y varias características fueron cambiadas o modificadas para mejorar el cultivo (por ejemplo, la pérdida de dormancia). Aunque el algodón cultivado en ocasiones se establece fuera de las áreas de cultivo en México, no se le considera como maleza o como especie invasiva. El algodón cultivado y el algodón feral no se consideran como malezas ni como especie invasiva en México y no se espera que las características biotecnológicas que confieren resistencia contra insectos y tolerancia a herbicidas modifiquen el potencial para que el algodón se convierta en maleza o sea más invasivo.

Las características introducidas de resistencia al ataque de insectos plaga objetivo y de tolerancia a los herbicidas dicamba, glufosinato y glifosato, confieren una ventaja selectiva sólo en condiciones específicas (por ejemplo, el ataque de los insectos plaga objetivo o aplicaciones de herbicidas que contengan dicamba, glufosinato o glifosato), de corta duración y limitadas espacialmente. Las ventajas de las características biotecnológicas en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 son de interés agronómico y es improbable que incrementen el establecimiento o supervivencia fuera de cultivo de las plantas de algodón con respecto al algodón convencional. Por lo tanto, el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 representa un riesgo insignificante para el medio ambiente.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

I.h. Secuencia génica del evento de transformación (tamaño del fragmento, sitio de inserción y oligonucleótidos).

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard®III [que es un evento apilado por cruce mendeliano que se compone de los eventos Bollgard®II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex® (MON 88913) y DGT® (MON 88701).

Se realizó un estudio para confirmar la presencia e integridad de los insertos y secuencias de ADN flanqueante de los insertos MON 88702, MON 15985, MON 531, MON 88701 y MON 88913 en el producto apilado de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Esto mediante la comparación de estas secuencias con las secuencias previamente determinadas para cada evento individual.

Los resultados de este estudio, donde se explica sobre las secuencias génicas, tamaños de fragmentos, sitios de inserción y oligonucleótidos incluidos en los eventos de transformación individuales que componen el evento apilado, se discutieron previamente en la sección **I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**, subsección **Confirmación de la presencia de los eventos individuales en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913** (Ver Págs. 37-43).

I.i. Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros.

SECUENCIAS FLANQUEANTES.

Los fragmentos de ADN insertados en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 corresponden a los que contienen sus líneas parentales, los eventos sencillos MON 88702, Bollgard®III (COT102 × MON 15985), MON 88913 y MON 88701. Por lo tanto, las características de las inserciones y secuencias flanqueantes 5' y 3' están conservadas en este evento apilado. Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas de los eventos individuales comprendidos en MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se muestran en las Tablas 1–6. Las representaciones esquemáticas de los vectores utilizados para transferir los insertos en los eventos individuales se presentan en las Figuras 1-5 y 8 de la **sección I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**, y las representaciones esquemáticas lineales se presentan en las Figuras 9-14 (**ANEXO 11. MSL0029106 Análisis de Secuencia de eventos individuales en evento apilado**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Para información más detallada sobre los componentes individuales, fuente y función de las secuencias del evento COT102 contenidas en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto y la Figura 14.

NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS.

Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).

Se realizaron análisis de secuenciación y bioinformáticos a ADN genómico del evento MON 88702 para confirmar la secuencia insertada, el sitio de inserción y las secuencias flanqueantes del ADN genómico del algodón.

Los resultados confirmaron un único inserto en MON 88702 de 3,143 pb (ADN-T I), que cada elemento genético en el inserto está intacto y que la secuencia del inserto es idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido PV-GHIR508523 (Tablas 1 y 2). Además, se demostró que MON 88702 no contiene elementos del esqueleto del plásmido PV-GHIR508523 o del ADN-T II (Ver sección **I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**, Págs. 15-45).

Esto se confirmó para múltiples generaciones de MON 88702 utilizando NGS, para lo que se utilizó ADN de cinco generaciones de MON 88702. Con esto se demostró la estabilidad generacional del inserto de ADN-T I en MON 88702.

En conjunto, los resultados de esta caracterización demuestran que MON 88702 contiene una sola copia del inserto ADN-T I, conteniendo el cassette de expresión de la secuencia codificante de *mCry51Aa2*, que el inserto no contiene secuencias del esqueleto del plásmido y se encuentra integrado de manera estable en un *locus* individual y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos a través de múltiples generaciones (**ANEXO 5. Solicitud MON 88702 FDA**).

Evento Bollgard®III (Desarrollado por Monsanto bajo contrato de licenciamiento del evento COT102) y los eventos comprendidos en el (COT102 x Bollgard®II).

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1. Syngenta resumió los resultados del análisis de hibridación Southern blot del ADN genómico usado para evaluar el evento insertado. Basados en esos análisis, **Syngenta declara que el evento COT102 contiene un inserto con una copia sencilla de los cassettes de expresión de los genes *vip3Aa19* y *aph4***, sin encontrarse transferencia de secuencias fuera del DNA-T (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica Evento COT102 FDA 2005**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El algodón Bollgard®II (MON 15985) fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* de *B. thuringiensis* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), que contiene los genes *cry1Ac* y *nptII*, mediante bombardeo de partículas o biobalística. El plásmido utilizado para la transformación fue el PV-GHBK11 (Figura 4), que contiene los cassettes de los genes *cry2Ab* y *uidA*. El plásmido se propagó en *E. coli* y se purificó de suspensiones bacterianas usando una columna de purificación. En las Tablas 3 y 4, se muestran resúmenes de los componentes genéticos de los plásmidos PV-GHBK04 y PV-GHBK11, utilizados para obtener el algodón MON 531 y MON 15985, respectivamente.

Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de inserciones (número de *loci* de integración en el genoma del algodón), el número de copias (número de transgenes en un *locus* individual), la integridad de las regiones codificantes *cry2Ab* y *uidA*, la integridad de los cassettes de *cry2Ab* y *uidA*, y para confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Se utilizaron las secuencias del plásmido PV-GHBK11, el esqueleto del plásmido, las regiones codificantes *cry2Ab* y *uidA*, el promotor potenciado 35S CaMV y la secuencia de poliadenilación NOS 3'. Adicionalmente, se verificaron las regiones de unión 5' y 3' entre el inserto y el ADN de la planta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los datos muestran que el algodón MON 15985 contiene una inserción de ADN del fragmento lineal del plásmido PV-GHBK11. El inserto contiene una copia de cada cassette de expresión, *cry2Ab* y *uidA*. Este evento no contiene secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Por lo tanto, se concluye que en el evento MON 15985, se deben producir las proteínas Cry2Ab y GUS de tamaño normal, como resultado de la integración del segmento de ADN derivado del plásmido PV-GHBK11 (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

La caracterización del algodón Bollgard® (MON 531), contenido en el evento Bollgard®II (MON 15985), demostró que en el evento MON 531 hay dos insertos de ADN-T. El inserto funcional primario contiene una única copia del gen completo de *cry1Ac*, el gen *nptII* y el gen de resistencia a antibióticos *aad*. Este inserto de ADN-T también contiene una porción de 892 pares de bases del extremo 3' del gen *cry1Ac* fusionado a la secuencia de terminación transcripcional 7S 3'. Este segmento de ADN se encuentra en el extremo 5' del inserto, en forma contigua y en orientación inversa al cassette del gen completo *cry1Ac* y no contiene un promotor. Se detectó un transcrito por transcripción inversa RT-PCR, que corresponde a este segmento 3' del gen *cry1Ac* y al ADN genómico adyacente. En la improbable eventualidad de que este ARN fuera traducido, el péptido resultante sería altamente homólogo a la porción correspondiente al dominio C-terminal de la proteína Cry1Ac. La seguridad de esta proteína teórica se demuestra con los estudios descritos en las secciones siguientes, ya que la proteína, de ser producida, habría sido un componente en todos los estudios de seguridad llevados a cabo tanto con la proteína Cry1Ac, como con plantas o semillas de algodón MON 531 (Serdy *et al.*, 1994).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El segundo inserto de ADN-T contiene una porción de 242 pares de bases de la secuencia de poliadenilación 7S 3' de la región terminal del gen *cry1Ac*. No se detectó transcrito de ARN por transcripción inversa RT-PCR, que correspondiera o hubiera sido transcrito del inserto de ADN-T de 242 pares de bases 7S 3', por lo tanto, no se produce ningún péptido, según lo esperado (**ANEXO 12. MSL16882 Caracterización Molecular Extendida Bollgard® MON 531**).

La caracterización molecular del evento MON 15985 fue descrita por Doherty et al. (2000). **Esta caracterización, basada en análisis de hibridación Southern blot, demostró que en MON 15985, adicional a los insertos de ADN presentes en su línea parental (MON 531), se había integrado una copia de ADN del fragmento de restricción utilizado para la transformación.** En este estudio, en el cual se realizaron análisis de PCR seguidos de secuenciación al inserto en MON 15985, se confirmaron los hallazgos previos demostrando el orden esperado de los elementos contenidos en el inserto del evento MON 15985. Además, se obtuvo la secuencia de ADN del inserto completo en el evento mencionado, la cual fue idéntica a lo previamente reportado (**ANEXO 13. MSL17099 Confirmación secuencias flanqueantes MON 15985**).

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

El evento MON 88913 fue generado mediante la integración estable de dos “cassettes” de expresión del gen *cp4 epsps* en el genoma del algodón, utilizando el sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens*. Los datos muestran que MON 88913 contiene una copia del ADN insertado en un *locus* simple de integración dentro del fragmento de restricción *SpeI* de ~13.0 kb, que contiene dos “cassettes” de expresión del gen *cp4 epsps* intactos. No se detectaron elementos adicionales del vector binario de transformación PV-GHGT35 (Figura 5) en el genoma del algodón MON 88913. La segregación mendeliana del fenotipo esperado en MON 88913 a través de múltiples generaciones, corrobora el análisis molecular de la estabilidad del inserto y establece el comportamiento genético del ADN insertado en un *locus* simple (**ANEXO 14. MSL19580 Análisis molecular de MON 88913**).

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

Se caracterizó el inserto de ADN en el evento MON 88701 por medio de análisis de hibridación Southern blot, PCR y análisis de secuencia de ADN. **Los resultados de esta caracterización demuestran que MON 88701 contiene una copia de los cassettes de expresión de los genes *dmo* y *bar*, no contiene secuencias del esqueleto del plásmido, el ADN-T se encuentra integrado de manera estable en un *locus* individual y se hereda de acuerdo a los principios mendelianos a través de múltiples generaciones.** Los elementos genéticos presentes en el algodón MON 88701 se muestran en la Tabla 6. Estas conclusiones se basaron en varias evidencias:

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

1) Se analizó por Southern blot todo el genoma del algodón para identificar la presencia del ADN-T y la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997, y se demostró que se insertó solo una copia del ADN-T en un solo sitio de inserción y que el inserto se hereda establemente;

2) Se realizaron análisis de secuencia para determinar la secuencia exacta del ADN insertado y las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto, permitiendo la comparación de la secuencia del ADN-T en el plásmido vector para confirmar que sólo las secuencias esperadas se integraron;

3) Se compararon las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional para identificar cualquier rearrreglo que pudiera ocurrir en el sitio de inserción durante la transformación. En conjunto, la caracterización de la modificación genética demuestra que una sola copia del ADN-T se integró establemente en un solo *locus* del genoma del algodón y que no hay secuencias del esqueleto del plásmido presentes en el algodón MON 88701.

Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de copias y de sitios de inserción del ADN integrado, así como la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. La estrategia de Southern blot fue diseñada para asegurar que todos los segmentos transgénicos potenciales se identificaran. Todo el genoma del algodón fue analizado utilizando sondas que abarcaban todo el plásmido vector para detectar la presencia del inserto, así como confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. Esto se logró usando sondas de no más de 2.5 Kb de largo para asegurar un alto nivel de sensibilidad del ensayo. Esto se demostró mediante la detección de un control positivo añadido a 0.1 copias de genomas equivalentes. Se escogieron específicamente dos sets de enzimas de restricción para caracterizar por completo el ADN-T y detectar cualquier fragmento potencial de ADN-T y secuencias del esqueleto del plásmido. Las enzimas de restricción fueron escogidas de manera que cada enzima corta una vez dentro del ADN-T insertado, y por lo menos una vez dentro del ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto. Como consecuencia, por lo menos un segmento conteniendo una porción del inserto con el ADN 5' flanqueante adyacente generado por un set de las enzimas es de tamaño predecible y se sobrepone con otro segmento de tamaño predecible conteniendo una porción del inserto con el ADN 3' flanqueante adyacente generado por otro set de enzimas. Este diseño de dos sets de enzimas asegura que el inserto completo se identifique en un patrón de hibridación predecible. Esta estrategia también maximiza la posibilidad de detectar una inserción en otro lugar del genoma que podría ser pasado por alto si esa banda co-migrara en el gel con una banda esperada.

Para determinar el número de copias y sitios de inserción del ADN-T, y la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido, se corrieron muestras por duplicado con la misma cantidad de ADN digerido en un gel de agarosa. Un set de muestras se corrió por un periodo de

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

tiempo mayor (corrida larga) que el segundo set (corrida corta). La corrida larga permite mayor resolución de ADN de alto peso molecular, mientras que la corrida corta permite retener el ADN de bajo peso molecular en el gel. Estos análisis determinaron que se insertó una sola copia del ADN-T en un solo *locus* de integración en el genoma del algodón y que no se detectaron elementos adicionales incluyendo secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997 en el algodón MON 88701.

Los análisis de PCR y de secuencia de ADN complementan los análisis de hibridación Southern blot. Se realizaron estos análisis adicionales para determinar la secuencia completa de ADN del inserto y secuencias de ADN flanqueantes en el algodón MON 88701, confirmaron la organización predicha de los elementos genéticos dentro del inserto, y determinaron las secuencias flanqueando el inserto. Adicionalmente, los análisis de secuencia confirmaron que cada elemento genético (excepto por las regiones borde) en el inserto está intacta y que la secuencia del inserto es idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido PV-GHHT6997 (Figuras 6 y 7). Más aún, la organización genómica del inserto MON 88701 se determinó comparando la secuencia flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional. Los análisis de hibridación Southern blot confirmaron que el ADN-T reportado representa el único inserto detectable en el evento MON 88701 (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

EXPRESIÓN.

Evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Se realizó un análisis cuantitativo para evaluar los niveles de las proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, GUS, Vip3Aa19, APH4, DMO, PAT (*bar*) y CP4 EPSPS en tejido de hoja (OSL1 y OSL4), raíz (OSR3), semilla y polen de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y de los eventos individuales que lo componen (MON 88702, MON 15985, COT102, MON 88701 y MON 88913), colectados en cinco localidades durante los ensayos de campo de Estados Unidos de 2016, mediante inmunoensayo multiplex (Tablas 10-19). Los niveles de las proteínas se reportaron en microgramos por gramo en base a peso seco (**ANEXO 15. MSL0028563 Expresión Lygus Stack 2016**).

Niveles de la proteína mCry51Aa2.

El nivel medio de la proteína mCry51Aa2 en cinco sitios para MON 88702 fue más alto en hoja (OSL1) a 1,500 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 3.9 µg/g en peso seco.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El nivel medio de la proteína mCry51Aa2 en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 1,200 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 5.1 µg/g en peso seco.

Niveles de la proteína Cry1Ac.

El nivel medio de la proteína Cry1Aac en cinco sitios para MON 15985 fue más alto en hoja (OSL1) a 47 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 0.40 µg/g en peso seco.

El nivel medio de la proteína Cry1Aac en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 51 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 0.41 µg/g en peso seco.

Niveles de la proteína Cry2Ab2.

El nivel medio de la proteína Cry2Ab2 en cinco sitios para MON 15985 fue más alto en hoja (OSL1) a 710 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 0.54 µg/g en peso seco.

El nivel medio de la proteína Cry2Ab2 en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 880 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 0.56 µg/g en peso seco.

Niveles de la proteína NPTII.

El nivel medio de la proteína NPTII en cinco sitios para MON 15985 fue más alto en hoja (OSL1) a 49 µg/g en peso seco y más bajo en polen con una cantidad menor al límite de cuantificación (<LDC) del análisis (0.56 µg/g en peso seco).

El nivel medio de la proteína NPTII en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 47 µg/g en peso seco y más bajo en polen con una cantidad menor al límite de cuantificación (<LDC) del análisis (0.56 µg/g en peso seco).

Niveles de la proteína GUS.

El nivel medio de la proteína GUS en cinco sitios para MON 15985 fue más alto en hoja (OSL1) a 610 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 1.7 µg/g en peso seco.

El nivel medio de la proteína GUS en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 650 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 2.2 µg/g en peso seco.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Niveles de la proteína Vip3Aa19.

El nivel medio de la proteína Vip3Aa19 en cinco sitios para COT102 fue más alto en hoja (OSL1) a 120 µg/g en peso seco y más bajo en raíz (OSR3), semilla y polen con cantidades menores a los límites de cuantificación (<LDC) del análisis para cada tejido (9.08 µg/g en peso seco, 4.32 µg/g en peso seco y 4.32 µg/g en peso seco).

El nivel medio de la proteína Vip3Aa19 en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 66 µg/g en peso seco y más bajo en raíz (OSR3), semilla y polen con cantidades menores a los límites de cuantificación (<LDC) del análisis para cada tejido (9.08 µg/g en peso seco, 4.32 µg/g en peso seco y 4.32 µg/g en peso seco).

Niveles de la proteína APH4.

El nivel medio de la proteína APH4 en cinco sitios para COT102 fue más alto en polen a 37 µg/g en peso seco y más bajo en hoja (OSL4), raíz (OSR3) y semilla con cantidades menores a los límites de cuantificación (<LDC) del análisis para cada tejido (1.60 µg/g en peso seco, 0.60 µg/g en peso seco y 0.76 µg/g en peso seco).

El nivel medio de la proteína APH4 en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en polen a 43 µg/g en peso seco y más bajo en hoja (OSL1 y OSL4), raíz (OSR3) y semilla con cantidades menores a los límites de cuantificación (<LDC) del análisis para cada tejido (1.60 µg/g en peso seco, 1.60 µg/g en peso seco, 0.60 µg/g en peso seco y 0.76 µg/g en peso seco).

Niveles de la proteína DMO.

El nivel medio de la proteína DMO en cinco sitios para MON 88701 fue más alto en hoja (OSL1) a 320 µg/g en peso seco y más bajo en polen con una cantidad menor al límite de cuantificación (<LDC) del análisis (0.60 µg/g en peso seco).

El nivel medio de la proteína DMO en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 360 µg/g en peso seco y más bajo en polen con una cantidad menor al límite de cuantificación (<LDC) del análisis (0.60 µg/g en peso seco).

Niveles de la proteína PAT.

El nivel medio de la proteína PAT en cinco sitios para MON 88701 fue más alto en semilla a 10 µg/g en peso seco y más bajo en polen con una cantidad menor al límite de cuantificación (<LDC) del análisis (0.08 µg/g en peso seco).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El nivel medio de la proteína PAT en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en semilla a 14 µg/g en peso seco y más bajo en polen con una cantidad menor al límite de cuantificación (<LDC) del análisis (0.08 µg/g en peso seco).

Niveles de la proteína CP4 EPSPS.

El nivel medio de la proteína CP4 EPSPS en cinco sitios para MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 2,400 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 4.3 µg/g en peso seco.

El nivel medio de la proteína CP4 EPSPS en cinco sitios para MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue más alto en hoja (OSL1) a 3,800 µg/g en peso seco y más bajo en polen a 5.0 µg/g en peso seco.

Tabla 10. Niveles de expresión de la proteína mCry51Aa2 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	1,200 (420) 580-1,900	0.56
OSL4	“Cutout”	1,100 (430) 560-1,700	0.56
OSR3	Floración Máxima	210 (39) 150-290	0.18
Semilla	Madurez	170 (34) 120-270	0.28
Polen	Floración Máxima	5.1 (1.9) 3.8-8.3	0.28

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido al rechazo de tres muestras con resultados no esperados y n=5 para polen, donde solo se analizó una muestra por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 11. Niveles de expresión de la proteína Cry1Ac en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido¹	Estadio de Desarrollo²	Media (DS) Rango (µg/g ps)³	LDC (µg/g ps)⁴
OSL1	2-4 nudos	51 (19) 15-90	0.32
OSL4	“Cutout”	33 (21) 11-85	0.32
OSR3	Floración Máxima	1.5 (1.0) 0.57-5.2	0.16
Semilla	Madurez	8.2 (1.8) 6.4-12	0.16
Polen	Floración Máxima	0.41 (0.092) 0.33-0.56	0.16

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido al rechazo de tres muestras con resultados no esperados y n=5 para polen, donde solo se analizó una muestra por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 12. Niveles de expresión de la proteína Cry2Ab2 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido¹	Estadio de Desarrollo²	Media (DS) Rango (µg/g ps)³	LDC (µg/g ps)⁴
OSL1	2-4 nudos	880 (560) 310-2,100	0.48
OSL4	“Cutout”	460 (160) 290-940	0.48
OSR3	Floración Máxima	150 (32) 100-190	0.10
Semilla	Madurez	340 (49) 240-410	0.20
Polen	Floración Máxima	0.56 (0.26) 0.33-0.96	0.20

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido al rechazo de tres muestras con resultados no esperados y n=5 para polen, donde solo se analizó una muestra por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 13. Niveles de expresión de la proteína NPTII en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	47 (25) 3.6-100	1.20
OSL4	“Cutout”	36 (12) 12-66	1.20
OSR3	Floración Máxima	3.4 (0.37) 2.7-4.1	0.28
Semilla	Madurez	4.1 (1.2) 1.3-6.6	0.56
Polen	Floración Máxima	<LDC (NA ⁵) 0.33-0.96	0.56

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido al rechazo de tres muestras con resultados no esperados y n=5 para polen, donde solo se analizó una muestra por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

⁵ NA= No Aplicable.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 14. Niveles de expresión de la proteína GUS en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	650 (180) 320-960	2.40
OSL4	“Cutout”	360 (170) 120-830	2.40
OSR3	Floración Máxima	27 (6.2) 20-38	0.60
Semilla	Madurez	44 (12) 25-68	1.20
Polen	Floración Máxima	2.2 (0.20) 1.9-2.4	1.24

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido al rechazo de tres muestras con resultados no esperados y n=5 para polen, donde solo se analizó una muestra por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 15. Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa19 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	66 (22) 43-110	19.84
OSL4	“Cutout”	31 (9.0) 20-48	19.84
OSR3	Floración Máxima	<LDC (NA ⁵) NA-NA	9.08
Semilla	Madurez	<LDC (NA) NA-NA	4.32
Polen	Floración Máxima	<LDC (NA) NA-NA	4.32

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=16 para OSL1 debido a que una muestra expresó por debajo del límite de cuantificación (<LDC) y al rechazo de tres muestras con resultados no esperados, n=13 para OSL4 debido a que siete muestras expresaron <LDC, n=20 para OSR3 y semilla debido a 20 muestras expresando <LDC, y n=5 para polen debido a 5 muestras expresando <LDC, donde solo se analizó una muestra por sitio).⁴ LDC= Límite de cuantificación.⁵ NA= No Aplicable.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 16. Niveles de expresión de la proteína APH4 en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	<LDC (NA ⁵) NA-NA	1.60
OSL4	“Cutout”	<LDC (NA) NA-NA	1.60
OSR3	Floración Máxima	<LDC (NA) NA-NA	0.60
Semilla	Madurez	<LDC (NA) NA-NA	0.76
Polen	Floración Máxima	43 (3.6) 38-48	0.76

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=12 para OSL1 debido a que cinco muestras expresaron por debajo del límite de cuantificación (<LDC) con un promedio de 3.6 µg/g en peso seco (ps) y tres muestras rechazadas con resultados no esperados, n=20 para OSL4, OSR3 y semilla debido a 20 muestras expresando <LDC, y n=5 para polen, donde solo se analizó una muestra por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

⁵ NA= No Aplicable.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 17. Niveles de expresión de la proteína DMO en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	360 (140) 160-700	1.36
OSL4	“Cutout”	150 (60) 76-330	1.36
OSR3	Floración Máxima	25 (7.8) 13-46	0.30
Semilla	Madurez	51 (22) 17-97	0.60
Polen	Floración Máxima	<LDC (NA ⁵) NA-NA	0.60

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido al rechazo de tres muestras con resultados no esperados y n=5 para polen debido a 5 muestras expresando <LDC, donde solo se analizó una muestra por sitio).⁴ LDC= Límite de cuantificación.⁵ NA= No Aplicable.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 18. Niveles de expresión de la proteína PAT (*bar*) en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	11 (5.1) 4.2-19	0.16
OSL4	“Cutout”	5.7 (2.1) 3.0-11	0.16
OSR3	Floración Máxima	2.9 (0.92) 1.9-6.0	0.06
Semilla	Madurez	14 (3.8) 5.0-19	0.08
Polen	Floración Máxima	<LDC (NA ⁵) NA-NA	0.08

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido a tres muestras rechazadas con resultados no esperados y n=5 para polen, debido a cinco muestras expresando <LDC, donde solo una muestra fue analizada por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

⁵ NA= No Aplicable.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 19. Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en tejidos de algodón colectados de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 producido en las evaluaciones de campo en Estados Unidos en 2016.

Tipo de Tejido ¹	Estadio de Desarrollo ²	Media (DS) Rango (µg/g ps) ³	LDC (µg/g ps) ⁴
OSL1	2-4 nudos	3,800 (1,100) 1,500-5,600	1.20
OSL4	“Cutout”	1,700 (690) 830-3,300	1.20
OSR3	Floración Máxima	260 (70) 130-400	0.32
Semilla	Madurez	370 (100) 160-540	4.80
Polen	Floración Máxima	5.0 (0.14) 4.8-5.1	0.60

¹ OSL = (Over Season Leaf) = Hoja analizada.

² Estado de desarrollo del algodón en que se colectó cada muestra.

³ Los niveles de proteína están expresados como la media aritmética y desviación estándar (DS) en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base a peso seco (ps). La media, desviación estándar y rangos (valores mínimo y máximo) se calcularon para cada tejido incluyendo todos los sitios (n=20, excepto n=17 para OSL1 debido a tres muestras rechazadas con resultados no esperados y n=5 para polen, donde solo una muestra fue analizada por sitio).

⁴ LDC= Límite de cuantificación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

I.j. Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres, expresión de las proteínas y su localización.

MAPA DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard®III [que es un evento apilado por cruce mendeliano que se compone de los eventos Bollgard®II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex® (MON 88913) y DGT® (MON 88701).

Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas de los eventos individuales comprendidos en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se muestran en las Tablas 1–6. Las representaciones esquemáticas de los vectores utilizados para transferir los insertos en los eventos individuales se presentan en las Figuras 1-5 y 8, y las representaciones esquemáticas lineales se presentan en las Figuras 9-14 (**ANEXO 11. MSL0029106 Análisis de Secuencia de eventos individuales en evento apilado**).

TIPO DE HERENCIA DE LOS CARACTERES.

Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).

Para la caracterización del evento MON 88702 se aisló ADN genómico de semilla de cinco generaciones de MON 88702 y del control convencional. Estas bibliotecas de ADN se usaron para generar lecturas de secuencia cortas de ~125 pares de bases (pb), distribuidas al azar del genoma del algodón, mediante secuenciación de siguiente generación (NGS, Next Generation Sequencing, por sus siglas en inglés).

Después se utilizó análisis bioinformático para seleccionar lecturas que contenían las secuencias significativamente similares al plásmido de transformación y fueron analizadas a profundidad para determinar el número de insertos de ADN.

Se determinaron la secuencia completa del inserto y los flancos mediante NGS, evaluando si la secuencia del inserto era idéntica a la secuencia correspondiente del ADN-T I in el plásmido PV-GHIR508523, y si cada elemento genético del inserto estaba intacto.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Los resultados confirmaron un único inserto en MON 88702 de 3,143 pb (ADN-T I), que cada elemento genético en el inserto está intacto y que la secuencia del inserto es idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido PV-GHIR508523 (Tablas 1 y 2). Además, se demostró que MON 88702 no contiene elementos del esqueleto del plásmido PV-GHIR508523 o del ADN-T II. Esto se confirmó para múltiples generaciones de MON 88702 utilizando NGS, para lo que se utilizó ADN genómico de cinco generaciones de MON 88702. Con esto se demostró la estabilidad generacional del inserto de ADN-T I en MON 88702.

Los resultados de esta caracterización demuestran que MON 88702 contiene una sola copia del inserto ADN-T I, conteniendo el cassette de expresión de la secuencia codificante de *mCry51Aa2*, que el inserto no contiene secuencias del esqueleto del plásmido y se encuentra integrado de manera estable en un *locus* individual y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos a través de múltiples generaciones (**ANEXO 5. Solicitud MON 88702 FDA**).

Evento Bollgard®III (Desarrollado por Monsanto bajo contrato de licenciamiento del evento COT102) y los eventos comprendidos en el (COT102 x Bollgard®II).

Monsanto desarrolló el algodón Bollgard®III, evento apilado que presenta resistencia al ataque de insectos lepidópteros plaga objetivo, mediante cruce mendeliana convencional entre el evento Bollgard®II (MON 15985) de Monsanto y el evento COT102 de Syngenta. Esto se realizó bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína insecticida Vip3A, aislada de *B. thuringiensis* cepa AB88. De igual manera, el evento MON 15985 se produjo a través de la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), variedad DP 50 B. El algodón MON 531 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Ambos eventos (COT102 y MON 15985) proveen protección contra daños por ataque de varias especies de insectos lepidópteros plaga del algodón.

Evento COT102 (Propiedad de Syngenta y licenciado a Monsanto).

La compañía Syngenta caracterizó la heredabilidad del transgén utilizando pruebas estándar para cruces mendelianas. Se realizaron análisis de Chi-cuadrada a los segregantes para mostrar un patrón de herencia estable como se esperaba para un transgén integrado individualmente.

Para información detallada consultar la información de heredabilidad del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Bollgard®II (MON 15985) (Propiedad de Monsanto).

Para determinar la estabilidad del evento MON 15985 a través de generaciones, se realizaron una serie de pruebas de progenie basadas en un análisis ELISA cuantitativo de la proteína Cry2Ab de cuatro generaciones. La significancia estadística se determinó usando análisis de Chi-cuadrada. Todas las generaciones segregaron como se esperaba con un solo sitio de inserción del evento MON 15985. La progenie R₁ del evento MON 15985 produjo el índice de segregación esperado de 3:1 respecto a la detección de la proteína Cry2Ab. El análisis de Chi-cuadrada de los resultados de segregación mostraron que el patrón de segregación fue consistente con un solo sitio de inserción en el ADN genómico del algodón y segrega de acuerdo con la genética mendeliana. Estos datos confirman que el inserto de ADN en el evento MON 15985 contiene un inserto de ADN en un *locus* individual que segrega de acuerdo con la genética mendeliana y que, por lo tanto, permanece integrado establemente en el genoma de la planta a través de generaciones de autopolinización y de retrocruzas sucesivas.

También se confirmó la estabilidad del evento MON 15985 por medio de análisis de hibridación Southern blot del inserto de ADN a través de generaciones múltiples. Se utilizaron muestras de ADN genómico de plantas de las generaciones R₁, R₂, R₃, R₄ y dos líneas retrocruzadas de segunda generación. Se utilizó toda la región codificante del gen *cry2Ab* para evaluar la estabilidad del ADN insertado a través del tiempo y generaciones de mejoramiento genético. Los resultados muestran que no hay diferencias en los patrones de hibridación entre el ADN extraído de las cinco generaciones. Esto demuestra que el inserto de ADN es estable en el genoma de la planta a través de cinco generaciones de mejoramiento genético (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

Durante el desarrollo del evento MON 88913 se realizaron análisis de datos de segregación fenotípica a través de varias generaciones. Se determinó la tolerancia a glifosato de plantas individuales mediante tiras reactivas para la proteína CP4EPSPS y/o tolerancia al herbicida glifosato. Después de la autopolinización de las plantas MON 88913, se plantaron las semillas de la generación R₁ y se esperaba que las plantas resultantes segregaran en un índice 3:1 a favor del fenotipo de tolerancia a glifosato como un solo *locus* de rasgo dominante. En las plantas R₁, el valor calculado de Chi-cuadrada para el fenotipo fue menos que el valor crítico de 3.84 con un nivel de error del 5% y, por lo tanto, el evento MON 88913 demostró el índice de segregación 3:1 esperado.

La generación R₂ representa un punto en el proceso de mejoramiento genético donde se puede identificar semilla homocigótica. Se identificaron plantas individuales tolerantes a glifosato de la generación R₁, se autopolinizaron para producir semilla de generación R₂ y se sometieron a

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

análisis de progenie para identificar lotes de semilla homocigótica. Se espera que las familias individuales R_2 segreguen en una razón 1:2 para homocigosis después de eliminar a los individuos susceptibles a glifosato de la población. Se generaron 76 familias R_2 y se probaron para homocigosis. El valor calculado de Chi-cuadrada fue menor que el valor crítico de 3.84 con un nivel de error de 5%. Por lo tanto, se recobró el número esperado de familias homocigóticas durante el proceso de mejoramiento genético. La selección de lotes de semilla de plantas homocigóticas fue exitosa en la generación R_3 y se confirmó en las generaciones R_4 y R_5 . Se espera que los lotes de semillas homocigóticas con el evento MON 88913 segreguen en una razón 1:0 para la característica de tolerancia a glifosato. Los resultados confirmaron la homocigosis y la estabilidad generacional del evento MON 88913 y, por lo tanto, la estabilidad del inserto de ADN (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

Se realizó un análisis de hibridación Southern blot a lo largo de cinco generaciones de algodón MON 88913. Durante los ensayos se comprobó que este evento contiene una sola copia del inserto en un solo *locus* de integración, el cual a su vez contiene dos copias intactas del gen *cp4 epsps* y no se encontraron secuencias adicionales del plásmido usado en la transformación. Además, se realizaron análisis de PCR y secuenciación para identificar los sitios de inserción y las regiones flanqueantes 5' y 3' del genoma del algodón, adyacentes a la construcción. Esto confirma la organización correcta de los elementos de la construcción y la estabilidad del evento en múltiples generaciones (**ANEXO 14. MSL19580 Análisis molecular de MON 88913**).

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

El inserto de ADN-T del evento MON 88701 reside en un *locus* individual dentro del genoma del algodón y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos de la herencia. Durante el desarrollo de este evento, se registraron datos de segregación fenotípica y genotípica para evaluar la herencia y estabilidad del evento MON 88701 utilizando el análisis de Chi-cuadrada a través de varias generaciones. El análisis de Chi-cuadrada se basa en comparaciones entre el índice de segregación observado y el índice de segregación esperado de acuerdo con los principios mendelianos.

Las plantas transformadas R_0 (generación R_0) se autopolinizaron para generar semilla de generación R_1 . Estas se analizaron utilizando análisis de PCR en tiempo real para la región codificante del gen *dmo*. Se seleccionó una sola planta homocigótica R_1 y se autopolinizó para generar plantas de generación R_2 que se autopolinizaron para generar semillas de generación R_3 . Los ensayos fenotípicos y genotípicos confirmaron la ausencia de segregación del inserto en estas generaciones autopolinizadas.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Las plantas homocigóticas positivas R_3 se cruzaron con un algodón propiedad de Monsanto que no contenía las secuencias codificantes de los genes *dmo* o *bar* por medio de técnicas de mejoramiento tradicional para producir semilla heterocigótica F_1 . Las plantas F_1 , heterocigóticas para el rasgo de tolerancia a dicamba y glufosinato, se cruzaron con un algodón propiedad de Monsanto que no contenía las secuencias codificantes de los genes *dmo* o *bar* por medio de técnicas de mejoramiento tradicionales para producir semilla BC_1F_1 . La generación BC_1F_1 se analizó utilizando aplicación del herbicida glufosinato para seleccionar plantas que contenían el evento MON 88701. Se confirmó que las plantas que sobrevivieron a la aplicación del herbicida eran heterocigóticas para el ADN-T del evento MON 88701 utilizando amplificación por PCR evento- específica con sondas TaqMan. Se autopolinizaron las plantas BC_1F_1 para producir las plantas BC_1F_2 . La generación BC_1F_2 fue analizada utilizando aplicación del herbicida glufosinato y las plantas sobrevivientes se analizaron utilizando amplificación por PCR evento-específica con sondas TaqMan para el ADN-T del evento MON 88701.

Se analizó la herencia del ADN-T en las generaciones R_1 , BC_1F_1 y BC_1F_2 . Se predijo una razón de herencia de 1:1 (heterocigoto: homocigoto negativo) del ADN-T del evento MON 88701 para la generación BC_1F_1 de acuerdo con los principios de herencia mendeliana. Se predijo que las generaciones R_1 y BC_1F_2 segregarían en una razón 1:2:1 (homocigoto positivo: heterocigoto: homocigoto negativo) de acuerdo con los principios de herencia mendeliana.

Se utilizó un análisis de Chi-cuadrada para comparar los índices de segregación observados del ADN-T del evento MON 88701 con los índices esperados. El valor de Chi-cuadrada en la generación BC_1F_1 indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el índice de segregación observado y el esperado (1:1) (heterocigoto: homocigoto negativo) del ADN-T del evento MON 88701. El valor de Chi-cuadrada para las generaciones R_1 y BC_1F_2 indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el índice de segregación observado y el esperado (1:2:1) (homocigoto positivo: heterocigoto: homocigoto negativo) del ADN-T del evento MON 88701. Estos resultados apoyan la conclusión de que el ADN-T del evento MON 88701 reside en un *locus* individual en el genoma del algodón y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos de herencia. Estos resultados también son consistentes con los datos de caracterización molecular que indican que el evento MON 88701 contiene una copia intacta de los cassettes de expresión de los genes *dmo* y *bar* insertados en un *locus* individual en el genoma del algodón.

Conclusión.

Tomando en cuenta la estabilidad de los elementos genéticos por varias generaciones, la segregación mendeliana también por varias generaciones, el bajísimo potencial de recombinación entre los insertos en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, y la viabilidad e idoneidad seriamente comprometidas de las células afectadas por el evento hipotético de translocación genómica, el riesgo de tal recombinación es

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

descartable, se concluye que los insertos de ADN en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se integraron de manera estable y las características conferidas son fenotípica y genéticamente estables a través de varias generaciones y condiciones ambientales.

EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

Se realizó un análisis cuantitativo para evaluar los niveles de las proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, GUS, Vip3Aa19, APH4, DMO, PAT (*bar*) y CP4 EPSPS en tejido de hoja (OSL1 y OSL4), raíz (OSR3), semilla y polen de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y de los eventos individuales que lo componen (MON 88702, MON 15985, COT102, MON 88701 y MON 88913), colectados en cinco localidades durante los ensayos de campo de Estados Unidos de 2016, mediante inmunoensayo multiplex (Tablas 10-19). Los niveles de las proteínas se reportaron en microgramos por gramo en base a peso seco (**ANEXO 15. MSL0028563 Expresión Lygus Stack 2016**).

Los resultados se discutieron previamente en la sección I.i. **Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros**, en la subsección **Expresión** (Ver Págs. 67-79).

LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTRODUCIDAS.

Las proteínas CP4 EPSPS, DMO y Cry2Ab se translocan a los cloroplastos, donde ejercen su función, mientras que mCry51Aa2, Cry1Ac y PAT se localizan en el citoplasma de la célula vegetal de las plantas de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Para información detallada sobre la localización de la proteína Vip3A producida a partir del evento COT102 contenido en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, consultar la información del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

I.k. Descripción del método de transformación.

a) Evento MON 88702.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El evento MON 88702 fue desarrollado por transformación mediada por *Agrobacterium* de algodón convencional, basándose en el método descrito por Chen et al. (2014), que permite la generación de plantas transformadas sin la utilización de callos. Se escindió el tejido meristemático de embriones de semillas convencionales germinadas. Después de co-cultivarse con *Agrobacterium* portando el constructo de transformación, los meristemas fueron puestos en un medio de selección conteniendo espectinomicina, sal disódica de carbenicilina y sal sódica de cefotaxima, para inhibir el crecimiento de células vegetales no transformadas y exceso de *Agrobacterium*. Entonces se colocaron los meristemas en un medio para desarrollar brotes seguido de transferencia a un semillero de propagación Jiffy Carefree® para desarrollar la raíz. Se seleccionaron plantas con raíz con características fenotípicas normales y se transfirieron al suelo para su crecimiento y evaluación posterior.

Las plantas R₀ generadas a través de este proceso de transformación se autopolinizaron para producir semillas R₁, y se segregaron las inserciones no ligadas ADN-T I y ADN-T II. Se identificaron las plantas R₁ positivas al cassette de expresión *mCry51Aa2* (ADN-T I) y que no contenían el cassette de expresión *aadA* (ADN-T II) mediante un análisis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) cuantitativa. Subsecuentemente, se seleccionaron las plantas R₁ homocigóticas para el ADN-T I para mayor desarrollo y sus progenies fueron sujetas a análisis molecular adicional, de eficacia contra insectos y de comparación fenotípica.

b) Evento Bollgard®III (COT102 x MON 15985).

I. Algodón COT102.

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1. La transformación del tejido de hipocótilos de algodón se realizó mediante incubación del tejido de la planta con células de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* (transformación mediada por *Agrobacterium*). Esta cepa porta dos plásmidos vectores separados, el vector pCOT-1 y un plásmido accesorio desarmado, pMP90. El plásmido accesorio proveyó los genes de virulencia necesarios para transferir el ADN-T del plásmido pCOT-1. Como el plásmido pMP90 no contenía ni genes inductores de tumores ni bordes de ADN-T, no se espera que su ADN se transfiriera al genoma del algodón. Después de la incubación con las células de *A. tumefaciens*, el tejido de hipocótilos se pasó a un medio sintético conteniendo el agente de selección, higromicina B. Las células de algodón transformadas expresando la proteína APH4 sobrevivieron la selección y subsecuentemente se generaron plantas.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

II. Evento Bollgard®II.

a. Evento Bollgard® (MON 531).

Para introducir el gen *cry1Ac* a las plantas de algodón fue utilizada la cepa ABI de *Agrobacterium*; la variedad de algodón a transformar fue Coker 312. Los procedimientos utilizados para la transformación de explantes de hipocótilos de algodón con *Agrobacterium* fueron de acuerdo con los descritos por Umbeck *et al.*, 1987. Las plantas de algodón fueron regeneradas siguiendo el procedimiento de Trolinder y Goodin (1987).

b. Evento Bollgard®II (MON 15985).

El algodón MON-15985-7 se obtuvo mediante transferencia de los genes *cry2Ab* y *uidA* al algodón biotecnológico Bollgard® variedad DP 50 B (que contenía los genes *cry1Ac*, *nptII* y *aad*). El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón Bollgard® DP 50 B (portadora del gen *cry1Ac*) fue el de “biobalística” (John *et al.* 1997) utilizando el plásmido B1579.

c) Evento Solución Faena Flex® (MON 88913).

El algodón MON 88913 fue obtenido mediante transformación mediada por *A. tumefaciens* empleando el plásmido PV-GHGT35. La línea parental del algodón MON 88913 es la variedad de algodón Coker 312 y el evento MON 88913 se transfirió a variedades comerciales mediante cruzamiento convencional. Se utilizó la variedad Coker 312 debido a su respuesta positiva al sistema de cultivo de tejidos usado en el proceso de producción de plantas transgénicas. Varios investigadores (Trolinder y Goodin, 1987; Umbeck, *et al.*, 1987) han demostrado que la variedad Coker 312 y un grupo de variedades relacionados a esa línea, tienen una característica de respuesta favorable al cultivo de tejidos. La variedad Coker 312, aunque no se cultiva ampliamente, es un cultivar aceptado comercialmente.

d) Evento DGT® (MON 88701).

El evento MON 88701 se desarrolló por transformación, mediada por *Agrobacterium*, de hipocótilos de algodón de la variedad Coker 130 utilizando el vector PV-GHHT6997 basado en métodos publicados (Duncan, 2010; Duncan y Ye, 2011). En resumen, se escindieron segmentos de hipocótilos de semilla germinada de algodón Coker 130. Después de incubar con *Agrobacterium* conteniendo el vector, los segmentos se colocaron en secuencia en medios

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

para crecimiento de callos conteniendo carbenicilina y cefotaxima para inhibir el crecimiento del exceso de *Agrobacterium* y glufosinato para inhibir el crecimiento de células no transformadas. Los embriones desarrollándose en el medio de cultivo se cambiaron a un medio que contenía reguladores de crecimiento conducentes a la regeneración de brotes, pero sin antibióticos o glufosinato. Se seleccionaron plantas R₀ con raíz con características fenotípicas normales y se transfirieron a suelo para crecimiento y posterior análisis.

Las plantas R₀ generadas se autopolinizaron para producir semilla de generación R₁. Las plantas R₀ y R₁ se analizaron para tolerancia a dicamba y glufosinato y también se comprobó la presencia de ADN-T (cassettes de expresión *dmo* y *bar*) y ausencia de secuencias del esqueleto del vector del plásmido. Subsecuentemente, las plantas transformadas R₁ se autopolinizaron para originar plantas generación R₂. Se identificaron las plantas homocigotas R₂ conteniendo solo un inserto de ADN-T mediante una combinación de técnicas analíticas incluyendo aspersiones de dicamba y glufosinato, PCR y análisis de hibridación Southern, lo que resultó en la producción del algodón MON 88701 tolerante a los herbicidas dicamba y glufosinato (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

III. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

El sistema de transformación con *A. tumefaciens* es bien conocido y ha sido utilizado durante muchos años en la modificación genética de diversas plantas dicotiledóneas. El plásmido vector fue modificado de manera tal que el sistema de transformación no pudiera transmitir la enfermedad de la agalla de la corona. Este sistema de transformación integra genes del plásmido vector dentro del cromosoma de la célula de la planta de forma estable.

La bacteria *A. tumefaciens* es un fitopatógeno que habita de manera natural en el suelo, el cual utiliza un proceso de ingeniería genética natural para alterar la maquinaria metabólica de las células de la planta hospedante. Este proceso hace que las plantas hospedantes desvíen suministros de carbono y nitrógeno orgánico para la producción de nutrientes (opinas) que pueden ser específicamente catabolizados por la bacteria invasora (Tempe y Schell, 1977). Las células infectadas son inducidas a proliferar. La enfermedad de la agalla de la corona es el resultado directo de la incorporación de una región de ADN-transferible (ADN-T), del plásmido circular Ti (inducción de tumor) de 150 a 250 kb, transferido por *A. tumefaciens* dentro del genoma de la planta hospedante.

La comprensión de este proceso natural de transformación y el hecho de que cualquier ADN externo colocado entre los bordes del ADN-T puede ser transferido a las células vegetales, permitió la construcción del primer vector y el sistema de cepas bacterianas para la transformación de plantas (Hooykaas y Shilperoort, 1992).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

IV. Biobalística.

Este método consiste en disparar pequeñas partículas de oro o tungsteno cubiertas de ADN a células vegetales jóvenes o embriones vegetales. Para esto las micropartículas son aceleradas a velocidades supersónicas que atraviesan la pared y membrana celular. Las partículas son de un tamaño aproximado de 0.4 a 2 µm de diámetro, están hechas de materiales densos como oro o tungsteno. De esta manera, algo del material genético se quedará en el interior de las células y se desprenderá de las micropartículas debido a modificaciones del entorno iónico. Este ADN se integra de forma estable en los cromosomas mediante un proceso de recombinación al azar. La eficiencia de transformación es más baja que utilizando *Agrobacterium*, pero la mayoría de las plantas pueden ser transformadas con este método. En este método, las construcciones genéticas son más simples e incluyen los genes de interés y de selección con sus respectivas secuencias regulatorias.

I.I. Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de efectos no esperados.

DESCRIPCIÓN.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard®III [que es un evento apilado por cruce mendeliano que se compone de los eventos Bollgard®II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex® (MON 88913) y DGT® (MON 88701).

Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).

Monsanto desarrolló el algodón MON 88702, que produce una proteína insecticida mCry51Aa2 (gen *mCry51Aa2*), derivada de la bacteria *B. thuringiensis*, que lo protege contra el daño de insectos hemípteros y tisanópteros plaga objetivo. El algodón MON 88702 se produjo mediante transformación de tejido de algodón mediada por *Agrobacterium*, utilizando el vector de transformación PV-GHIR508523 (Figura 1) de aproximadamente 14.6 kb (Tabla 1). Este plásmido contiene dos ADN de transformación (ADN-T) independientes, cada uno delineado por regiones borde derechas e izquierdas (**ANEXO 4. MSL0027648 Caracterización Molecular MON 88702**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Bollgard®III (Desarrollado por Monsanto bajo contrato de licenciamiento del evento COT102) y los eventos comprendidos en el (COT102 x Bollgard®II).

Monsanto desarrolló el algodón Bollgard®III, evento apilado que presenta protección contra el ataque de insectos lepidópteros plaga objetivo, mediante cruce mendeliana convencional entre el evento Bollgard®II (MON 15985) de Monsanto y el evento COT102 de Syngenta. Esto se realizó bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína insecticida Vip3A, aislada de *B. thuringiensis* cepa AB88. De igual manera, el evento MON 15985 se produjo a través de la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), variedad DP 50 B. El algodón MON 531 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Ambos eventos (COT102 y MON 15985) proveen protección contra daños por ataque de varias especies de insectos lepidópteros plaga del algodón (**ANEXO 6. MSL0024592 Southern blot confirma COT102 y MON 15985 en Bollgard 3**).

Evento COT102 (Propiedad de Syngenta y licenciado a Monsanto).

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1, utilizando los siguientes cassettes de expresión dentro de los bordes izquierdo y derecho de la región del ADN-T (la región designada para ser transferida e integrada al genoma de la planta de algodón) (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica Evento COT102 FDA 2005**):

1. Secuencia codificante del gen *aph4*, derivado de *E. coli*, que codifica el marcador selectivo enzima APH4; la expresión *in planta* del gen *aph4* es regulada corriente arriba por el promotor más el primer Intrón del gen *ubiquitina-3* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS 3 (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*).
2. Secuencia codificante del gen *vip3Aa19*, un gen sintético diseñado para alojar el sesgo de codones de maíz y codificando una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la proteína nativa Vip3A de *B. thuringiensis*, con la excepción de una sola sustitución de una lisina por una glutamina en la posición 284. La expresión *in planta* del gen *vip3Aa19* se regula corriente arriba por la región promotora (promotor más elementos asociados haciendo un total de 1,407 pb) del gen *actina-2* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa). Syngenta declara que el promotor confiere expresión constitutiva del gen *vip3Aa19*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Para información más detallada consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

Evento Bollgard®II (MON 15985) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 15985 fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* de *B. thuringiensis* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), que contiene los genes *cry1Ac* y *nptII*, mediante bombardeo de partículas o biobalística. El plásmido utilizado para la transformación fue PV-GHBK11 (Figura 4), que contiene los cassettes de los genes *cry2Ab* y *uidA*. El plásmido se propagó en *E. coli* y se purificó de suspensiones bacterianas usando una columna de purificación. El evento MON 15985 le provee al algodón resistencia al ataque de larvas de cinco especies de lepidópteros: gusano tabacalero (*H. virescens*), gusano bellotero (*H. zea*), gusano cogollero (*S. frugiperda*), gusano soldado (*S. exigua*) y gusano rosado (*P. gossypiella*) (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 88913 se desarrolló vía transformación con *A. tumefaciens* de la variedad de algodón Coker 312, para insertar un constructo con doble copia del gen *cp4 epsps* que codifica la enzima CP4 EPSPS. Esta proteína le confiere la característica de tolerancia a los herbicidas no selectivos de la familia Faena® (ingrediente activo glifosato). En este evento, que contiene un inserto único, las características de la inserción y de las secuencias flanqueantes están conservadas. Aparte de tolerancia al herbicida, conferida por la inserción del evento MON 88913, no hay diferencias biológicamente significativas entre el algodón MON 88913 y su contraparte convencional (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

Monsanto desarrolló el algodón MON 88701 tolerante a los herbicidas dicamba y glufosinato que permite aplicaciones de dicamba sobre el cultivo para controlar malezas de hoja ancha desde la preemergencia hasta siete días previos a la cosecha y de glufosinato para un amplio espectro de control de malezas desde la emergencia hasta la floración temprana. El evento MON 88701 provee una ventana de aplicación de dicamba más amplia más allá de los usos actuales de presembrado, y la aplicación de glufosinato a dosis y tiempos equivalentes a los

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

utilizados en el algodón tolerante a glufosinato comercial actual. La combinación de estos dos modos de acción herbicida únicos provee un sistema de manejo de malezas efectivo para la producción de algodón. El herbicida dicamba provee control efectivo sobre más de 95 especies de maleza anual y bianual y supresión de más de 100 especies de malezas perennes y leñosas. El glufosinato, que es un herbicida de contacto de amplio espectro, provee control no selectivo de aproximadamente 120 malezas de hoja ancha y zacates (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

NÚMERO DE COPIAS.

Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).

El número de copias insertadas se determinó identificando el número de secuencias de unión del inserto y el ADN genómico del algodón. Se identificaron dos sitios de unión en MON 88702 conteniendo la secuencia de unión entre el ADN-T I y el ADN genómico flanqueante de la planta, confirmando que hay una sola copia del inserto en MON 88702.

Los resultados de la caracterización molecular demuestran que MON 88702 contiene una sola copia del inserto ADN-T I (conteniendo la secuencia codificante de la proteína mCry51Aa2), que el inserto no contiene secuencias del esqueleto del plásmido, se encuentra integrado de manera estable en un *locus* individual y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos a través de múltiples generaciones (**ANEXO 5. Solicitud MON 88702 FDA**).

Evento Bollgard®III (Desarrollado por Monsanto bajo contrato de licenciamiento del evento COT102) y los eventos comprendidos en él (COT102 x Bollgard®II).

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1. Syngenta resumió los resultados del análisis de hibridación Southern Blot del ADN genómico usado para evaluar el evento insertado. Basados en esos análisis, **Syngenta declara que el evento COT102 contiene un inserto con una copia sencilla de los cassettes de expresión de los genes Vip3A(a) y aph4**, sin encontrarse transferencia de secuencias fuera del ADN-T (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica Evento COT102 FDA 2005**).

El algodón MON 15985 fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* de *B. thuringiensis* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531) variedad DP 50 B, que contiene los genes *cry1Ac* y *nptII*, mediante bombardeo de partículas o biobalística. El plásmido utilizado para la transformación fue el PV-GHBK11 (Figura 4), que contiene los cassettes de los genes *cry2Ab* y *uidA*. El

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

plásmido se propagó en *E. coli* y se purificó de suspensiones bacterianas usando una columna de purificación. En las Tablas 3 y 4 se muestran resúmenes de los componentes genéticos de los plásmidos PV-GHBK04 y PV-GHBK11, utilizados para obtener el algodón MON 531 y MON 15985, respectivamente.

El ADN insertado en el algodón MON 15985 se caracterizó por medio de técnicas moleculares tradicionales. Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de inserciones (número de *loci* de integración en el genoma del algodón), el número de copias (número de transgenes en un *locus* individual), la integridad de las regiones codificantes *cry2Ab* y *uidA*, la integridad de los cassettes de expresión de *cry2Ab* y *uidA*, y para confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Se utilizaron las secuencias del plásmido PV-GHBK11, el esqueleto del plásmido, las regiones codificantes *cry2Ab* y *uidA*, el promotor potenciado 35S CaMV y la secuencia de poliadenilación NOS 3'. Adicionalmente, se verificaron las regiones de unión 5' y 3' entre el inserto y el ADN de la planta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los datos muestran que el algodón MON 15985 contiene una inserción de ADN del fragmento lineal del plásmido PV-GHBK11. El inserto contiene una copia de cada cassette de expresión, *cry2Ab* y *uidA*. Este evento no contiene secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Por lo tanto, se concluye que en el evento MON 15985, se deben producir proteínas Cry2Ab y GUS de tamaño normal, como resultado de la integración del segmento de ADN derivado del plásmido PV-GHBK11 (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

La caracterización del algodón Bollgard® (MON 531), contenido en el evento Bollgard®II (MON 15985), demostró que en MON 531 hay dos insertos de ADN-T. El inserto funcional primario contiene una única copia del gen completo de *cry1Ac*, el gen *nptII* y el gen de resistencia a antibióticos *aad*. Este inserto de ADN-T también contiene una porción de 892 pares de bases del extremo 3' del gen *cry1Ac* fusionado a la secuencia de terminación transcripcional 7S 3'. Este segmento de ADN se encuentra en el extremo 5' del inserto, en forma contigua y en orientación inversa al cassette del gen completo *cry1Ac* y no contiene un promotor. Se detectó un transcrito por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), que corresponde a este segmento 3' del gen *cry1Ac* y al ADN genómico adyacente. En la improbable eventualidad de que este ARN fuera traducido, el péptido resultante sería altamente homólogo a la porción correspondiente al dominio C-terminal de la proteína Cry1Ac. La seguridad de esta proteína teórica se demuestra con los estudios descritos en las secciones siguientes, ya que la proteína, de ser producida, habría sido un componente en todos los estudios de seguridad llevados a cabo tanto con la proteína Cry1Ac, como con plantas o semillas de algodón Bollgard® (Serdy *et al.*, 1994).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El segundo inserto de ADN-T contiene una porción de 242 pares de bases de la secuencia de poliadenilación 7S 3' de la región terminal del gen *cry1Ac*. No se detectó transcrito de ARN por RT-PCR, que correspondiera o hubiera sido transcrito del inserto de ADN-T de 242 pares de bases 7S 3', por lo tanto, no se produce ningún péptido, según lo esperado (**ANEXO 12. MSL16882 Caracterización Molecular Extendida Bollgard® MON-531**).

El algodón MON 15985 resistente al ataque de insectos plaga del orden *Lepidoptera* fue desarrollado por el método de biobalística, empleando el fragmento KpnI del plásmido PV-GHBK11 que contiene los cassettes de expresión de *cry2Ab* y *uidA*. El evento MON 15985 no contiene secuencias detectables del esqueleto del plásmido como producto de la transformación.

La caracterización molecular del evento MON 15985 fue descrita por Doherty *et al.* (2000). **Esta caracterización, basada en análisis de hibridación Southern blot, demostró que en MON 15985, adicional a los insertos de ADN presentes en su línea parental (Bollgard, MON 531), se había integrado una copia de ADN del fragmento de restricción utilizado para la transformación.** En este estudio, en el cual se realizaron análisis de PCR seguidos de secuenciación al inserto en MON 15985, se confirmaron los hallazgos previos demostrando el orden esperado de los elementos contenidos en el inserto del evento MON 15985. Además, se obtuvo la secuencia de ADN del inserto completo en el evento mencionado, la cual fue idéntica a lo previamente reportado (**ANEXO 13. MSL17099 Confirmación secuencias flanqueantes MON 15985**).

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

El evento MON 88913 fue generado mediante la integración estable de dos “cassettes” de expresión del gen *cp4 epsps* en el genoma del algodón, utilizando el sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens*. Los datos muestran que MON 88913 contiene una copia del ADN insertado en un *locus* simple de integración dentro del fragmento de restricción *SpeI* de ~13.0 kb que contiene dos “cassettes” de expresión del gen *cp4 epsps* intactos. No se detectaron elementos adicionales del vector binario de transformación PV-GHGT35 (Figura 5) en el genoma del algodón MON 88913. La segregación mendeliana del fenotipo esperado en MON 88913 a través de múltiples generaciones, corrobora el análisis molecular de la estabilidad del inserto y establece el comportamiento genético del ADN insertado en un *locus* simple (**ANEXO 14. MSL19580 Análisis molecular de MON 88913**).

Se realizaron análisis moleculares para caracterizar el ADN integrado en el evento MON 88913. Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de insertos de ADN (número de sitios de integración dentro del genoma del algodón), número de copias (el número

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

de copias en un mismo inserto), la integridad de los cassettes del gen *cp4 epsps*, y para establecer la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido en el genoma de la planta.

Los datos muestran que el evento MON 88913 contiene una copia del inserto de ADN en un locus de integración individual en un fragmento de restricción Spe I que contiene dos cassettes de expresión intactos del gen cp4 epsps. No se detectaron elementos adicionales del vector de transformación PV-GHGT35 (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

Se caracterizó el inserto de ADN en el evento MON 88701 por medio de un análisis de hibridación Southern blot, PCR y análisis de secuencia de ADN. **Los resultados de esta caracterización demuestran que MON 88701 contiene una copia de los cassettes de expresión de los genes *dmo* y *bar*, no contiene secuencias del esqueleto del plásmido, el ADN-T se encuentra integrado de manera estable en un locus individual y se hereda de acuerdo a los principios mendelianos a través de múltiples generaciones.** Los elementos genéticos presentes en el algodón MON 88701 se muestran en la Tabla 6. Estas conclusiones se basaron en varias evidencias:

- 1) Se analizó por Southern Blot todo el genoma del algodón para identificar la presencia del ADN-T y la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997, y se demostró que se insertó solo una copia del ADN-T en un solo sitio de inserción y que el inserto se hereda establemente;
- 2) Se realizaron análisis de secuencia para determinar la secuencia exacta del ADN insertado y las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto, permitiendo la comparación de la secuencia del ADN-T en el plásmido vector para confirmar que sólo las secuencias esperadas se integraron;
- 3) Se compararon las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional para identificar cualquier rearrreglo que pudiera ocurrir en el sitio de inserción durante la transformación. En conjunto, la caracterización de la modificación genética demuestra que una sola copia del ADN-T se integró establemente en un solo *locus* del genoma del algodón y que no hay secuencias del esqueleto del plásmido presentes en el algodón MON 88701.

Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de copias y de sitios de inserción del ADN integrado, así como la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. La estrategia del Southern blot fue diseñada para asegurar que todos los segmentos transgénicos potenciales se identificaran. Todo el genoma del algodón fue

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

analizado utilizando sondas que abarcaban todo el plásmido vector para detectar la presencia del inserto, así como confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. Esto se logró usando sondas de no más de 2.5 Kb de largo para asegurar un alto nivel de sensibilidad del ensayo. Esto se demostró mediante la detección de un control positivo añadido a 0.1 copias de genomas equivalentes. Se escogieron específicamente dos sets de enzimas de restricción para caracterizar por completo el ADN-T y detectar cualquier fragmento potencial de ADN-T y secuencias del esqueleto del plásmido. Las enzimas de restricción fueron escogidas de manera que cada enzima corta una vez dentro del ADN-T insertado, y por lo menos una vez dentro del ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto. Como consecuencia, por lo menos un segmento conteniendo una porción del inserto con el ADN 5' flanqueante adyacente generado por un set de las enzimas es de tamaño predecible y se sobrepone con otro segmento de tamaño predecible conteniendo una porción del inserto con el ADN 3' flanqueante adyacente generado por otro set de enzimas. Este diseño de dos sets de enzimas asegura que el inserto completo se identifique en un patrón de hibridación predecible. Esta estrategia también maximiza la posibilidad de detectar una inserción en otro lugar del genoma que podría ser pasado por alto si esa banda co-migrara en el gel con una banda esperada.

Para determinar el número de copias y sitios de inserción del ADN-T, y la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido, se corrieron muestras por duplicado con la misma cantidad de ADN digerido en un gel de agarosa. Un set de muestras se corrió por un periodo de tiempo mayor (corrida larga) que el segundo set (corrida corta). La corrida larga permite mayor resolución de ADN de alto peso molecular, mientras que la corrida corta permite retener el ADN de bajo peso molecular en el gel. Estos análisis determinaron que se insertó una sola copia del ADN-T en un solo *locus* de integración en el genoma del algodón y que no se detectaron elementos adicionales incluyendo secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997 en el algodón MON 88701.

Los análisis de PCR y de secuencia de ADN complementan los análisis de hibridación Southern blot. Se realizaron estos análisis adicionales para determinar la secuencia completa de ADN del inserto y secuencias de ADN flanqueantes en el algodón MON 88701, confirmaron la organización predicha de los elementos genéticos dentro del inserto, y determinaron las secuencias flanqueando el inserto. Adicionalmente, los análisis de secuencia confirmaron que cada elemento genético (excepto por las regiones borde) en el inserto está intacta y que la secuencia del inserto es idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido PV-GHHT6997 (Figuras 6 y 7). Más aún, la organización genómica del inserto MON 88071 se determinó comparando la secuencia flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional. Los análisis de hibridación Southern blot confirmaron que el ADN-T reportado representa el único inserto detectable en el evento MON 88701 (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

SITIOS DE INSERCIÓN.

Los fragmentos de ADN insertados en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 corresponden a los que contienen sus líneas parentales, los eventos sencillos MON 88702, Bollgard[®]III (COT102 × Bollgard[®]II), MON 88913 y MON 88701. Por lo tanto, las características de las inserciones y secuencias flanqueantes 5' y 3' están conservados en este evento apilado.

Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas de los eventos individuales comprendidos en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se muestran en las Tablas 1–6. Las representaciones esquemáticas de los vectores utilizados para transferir los insertos en los eventos individuales se presentan en las Figuras 1-5 y 8, y las representaciones esquemáticas lineales se presentan en las Figuras 9-14 (**ANEXO 11. MSL0029106 Análisis de Secuencia de eventos individuales en evento apilado**).

Para información más detallada sobre los componentes individuales, fuente y función de las secuencias del evento COT102 contenidas en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

EXPRESIÓN DE LAS SECUENCIAS IRRELEVANTES PARA LA EXPRESIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA.**Evento MON 88702.**

La secuencia codificante *mCry51Aa2* en el ADN-T I está bajo la regulación del potenciador *FMV*, el promotor *Hsp81-2* y la región no traducida 35 *CaMV* 3'. La secuencia *FMV* es un elemento genético del ARN 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (figwort mosaic virus, en inglés) (Richins *et al.*, 1987), que potencia la transcripción en la mayoría de las células vegetales (Rogers, 2000). La secuencia *Hsp81-2* es el promotor del gen de la proteína de shock 81-2 de *A. thaliana* (Yabe *et al.*, 1994), que funciona en la dirección de la transcripción en plantas vegetales. La secuencia 35S 3' es la región no traducida 3' del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*), que dirige la poliadenilación del RNA mensajero (ARNm) en células vegetales (Mogen *et al.*, 1990).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El ADN-T II contiene la secuencia codificante *aadA* bajo la regulación del potenciador *FMV*, el promotor *EF-1 α* , la secuencia líder *CTP2* y la región no traducida *T-E9*. El promotor *EF-1 α* consiste en las secuencias líder, promotor e intrón de *A. thaliana* que codifican el factor de elongación *EF-1 α* (Axelos *et al.*, 1989), que funciona en la dirección de la transcripción en plantas vegetales. La secuencia líder *CTP2* proviene del gen *ShkG* que codifica el péptido de tránsito para EPSPS en *A. thaliana* (Herrmann, 1995; Klee *et al.*, 1987), que funciona para dirigir el transporte de la proteína al cloroplasto. La secuencia *E9 3'* es la región no traducida 3' de la familia de genes *rbcS* de *Pisum sativum* (chícharo), que codifica la subunidad pequeña de la proteína ribulosa bisfosfato carboxilasa (Coruzzi *et al.*, 1984), que dirige la poliadenilación del ARNm (**ANEXO 5. Solicitud MON 88702 FDA**).

Evento COT102 (Propiedad de Syngenta y licenciado a Monsanto).

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1, utilizando los siguientes cassettes de expresión dentro de los bordes izquierdo y derecho de la región del ADN-T (la región designada para ser transferida e integrada al genoma de la planta de algodón) (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica Evento COT102 FDA 2005**):

1. Secuencia codificante del gen *aph4*, derivado de *E. coli*, que codifica el marcador selectivo enzima APH4; la expresión *in planta* del gen *aph4* es regulada corriente arriba por el promotor más el primer Intrón del gen *ubiquitina-3* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS 3 (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*).
2. Secuencia codificante del gen *vip3Aa19*, un gen sintético diseñado para alojar el sesgo de codones de maíz y codificando una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la proteína nativa Vip3A de *B. thuringiensis*, con la excepción de una sola sustitución de una lisina por una glutamina en la posición 284. La expresión *in planta* del gen *vip3Aa19* se regula corriente arriba por la región promotora (promotor más elementos asociados haciendo un total de 1,407 pb) del gen *actina-2* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa). Syngenta declara que el promotor confiere expresión constitutiva del gen *vip3Aa19*.

Para información más detallada consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Bollgard®II (MON 15985) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 15985 fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* de *B. thuringiensis* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), que contiene los genes *cry1Ac* y *nptII*, mediante bombardeo de partículas o biobalística. El plásmido utilizado para la transformación fue PV-GHBK11 (Figura 4), que contiene los cassettes de los genes *cry2Ab* y *uidA*.

Los elementos genéticos incluyen secuencias de ADN no funcionales necesarias para la clonación. El cassette de expresión que produce la proteína Cry2Ab consiste en el promotor potenciado 35S (Odell *et al.*, 1985), la secuencia codificante sintética completa *cry2Ab* y la región no traducida 3' del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*, que provee la señal para la poliadenilación del ARNm (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 88913 se desarrolló vía transformación con *A. tumefaciens* de la variedad de algodón Coker 312, para insertar un constructo con doble copia del gen *cp4 epsps* que codifica la enzima CP4 EPSPS.

Empezando por la región derecha del plásmido PV-GHGT35, la secuencia codificante *ctp2/cp4 epsps* en el primer cassette de expresión está bajo la regulación del promotor P-FMV/TSF1, que contiene el gen TSF1 de *A. thaliana* (que codifica el factor de elongación EF-1 α ; Axelos *et al.*, 1989) y secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (Richins *et al.*, 1987). Entre estas secuencias se encuentra la secuencia líder no traducida L-TSF1 (exón 1) proveniente del gen TSF1 de *A. thaliana* y la secuencia intrón no traducida I-TSF1 proveniente del gen TSF1 de *A. thaliana* (Axelos *et al.*, 1989). Al final se encuentra la secuencia T-E9 derivada de *P. sativum*, conteniendo la región 3' no traducida del gen E9 de la subunidad pequeña de la proteína ribulosa bisfosfato carboxilasa (*rbc*) del chícharo (Coruzzi *et al.*, 1984) para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm de *cp4 epsps*.

El segundo cassette de expresión de *ctp2/cp4 epsps*, que está en tándem con el primero descrito arriba, está bajo la regulación del promotor P-35S/ACT8 que contiene el promotor del gen ACT8 de *A. thaliana* (An *et al.*, 1996), combinado con secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Kay *et al.*, 1987). Entre estas secuencias se encuentra la secuencia líder no traducida L-ACT8 del gen ACT8 de *A. thaliana* y la secuencias intrón I-ACT8 y secuencia exón flanqueante del gen ACT8 de *A. thaliana* (An *et al.*, 1996). Al final se encuentra la secuencia T-E9 (Coruzzi *et al.*, 1984), idéntica a la del primer cassette de expresión, para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm de *cp4 epsps* (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

La secuencia codificante *dmo* en MON 88701 está bajo la regulación del promotor *PC1SV*, la secuencia líder *TEV 5'* y la región no traducida *E6 3'*. *PC1SV* es el promotor para el transcrito completo del virus de la mancha clorótica del cacahuete (Maiti y Shepherd, 1998), que dirige la transcripción en células vegetales. La secuencia líder *TEV 5'* es la región 5' no traducida del virus del grabado del tabaco (Niepel y Gallie, 1999) y está involucrada en la regulación de expresión génica. El péptido de tránsito al cloroplasto CTP2 dirige el transporte de la proteína DMO al cloroplasto y se deriva de la secuencia líder *CTP2* del gen *ShkG* de *A. thaliana* (Herrmann, 1995; Klee *et al.*, 1987). *E6 3'* es la secuencia 3' no traducida del gen *E6* de *Gossypium barbadense*, codificando una proteína fibrosa que funciona como directora de la poliadenilación del ARNm (John, 1996).

La secuencia codificante *dmo* en MON 88701 está bajo la regulación del promotor *e35S*, secuencia líder *Hsp70* y la región no traducida *nos 3'*. *e35S* es el promotor para el ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.*, 1985), que contiene la región potenciadora duplicada (Kay *et al.*, 1987), que dirige la transcripción en células vegetales. La secuencia líder *Hsp70* es la región 5' no traducida del gen *DnaK* de *Petunia hybrida* (Rensing y Maier, 1994; Winter *et al.*, 1988) y está involucrada en la regulación de la expresión génica. *nos 3'* es la región no traducida proveniente del gen de la nopalina sintasa (*nos*) de *A. tumefaciens* que codifica NOS que dirige la poliadenilación del ARNm (Bevan *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983).

Ninguna de las secuencias descritas arriba, se traducen en proteínas funcionales. Estas son secuencias que intervienen en la expresión de los genes de interés, que son responsables de la correcta expresión de las proteínas, que son a su vez responsables de las funciones deseadas.

I.m. Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard®III [que es un evento apilado por cruce mendeliana que se compone de los eventos Bollgard®II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex® (MON 88913) y DGT® (MON 88701).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Proteína mCry51Aa2.

El cassette de expresión *mCry51Aa2* en el evento MON 88702 codifica para la proteína mCry51Aa2, que consiste en un solo polipéptido (Figura 16). Esta proteína es altamente homóloga (aproximadamente 96% de similitud de secuencia) a la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa Cry51Aa2 de *B. thuringiensis*, con ocho substituciones de aminoácidos (F46S, Y54H, S95A, F147S, Q149E, S167R, P219R, R273W) y una delección de tres aminoácidos (Δ 196-198) (Gowda *et al.*, 2016).

MAILDLKSLV	LNAINYWGPK	NNNGIQGGDF	GYPISEKQID	TSIITSTHPR	50
LIPHDLTIPQ	NLETIFTTTQ	VLNNTDLQQ	SQTVSFAKKT	TTTTATSTTN	100
GWTEGGKISD	TLEEKVSVSI	PFIGEGGGKN	STTIEANFAH	NSSTTTSQEA	150
STDIEWNISQ	PVLVPPRKQV	VATLVIMGGN	FTIPMDLMTT	IDSTEHYSGY	200
PILTWISSPD	NSYSGRFMSW	YFANWPNLPS	GFGPLNSDNT	VTYTGSVVSQ	250
VSAGVYATVR	FDQYDIHNLW	TIEKTWYARH	ATLHNGKKIS	INNVTMAPT	300
SPIKTN					306

Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la proteína mCry51Aa2.**Proteína Cry1Ac**

La proteína codificada por el gen *cry1Ac* introducido en los algodones MON 531 y MON 15985 es idéntica en longitud (1,178 aminoácidos) y 99.4% idéntica en su secuencia de aminoácidos a la proteína codificada por el gen *cry1Ac* de *B. thuringiensis* subs. *kurstaki* (Adang *et al.*, 1985) (Figura 17). La secuencia codificante de este gen ha sido modificada para lograr su óptima expresión en plantas. La expresión del gen está dirigida por el promotor modificado (mejorado) 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.*, 1985; Kay *et al.*, 1987). La terminación transcripcional del RNAm proviene de la región 3' no traducida de la subunidad alfa del gen de la beta-conglicinina de la soya (referido como secuencia de terminación 7S 3') (Schuler *et al.*, 1982).

La comparación de la proteína Cry1Ac expresada en el algodón MON 531 con formulaciones insecticidas comerciales que contienen numerosas protoxinas de *B. thuringiensis* fue realizada mediante análisis Western blot. Este estudio mostró que la proteína expresada por el algodón MON 531 es similar en peso molecular y reactividad inmunológica a una o más proteínas contenidas en los productos comerciales Dipel® (Abbott Laboratories) y Thuricide® (Sandoz, Inc.). Sims (1995) demostró que la actividad biológica y especificidad de la longitud completa de la proteína Cry1Ac expresada en el algodón MON 531 es equivalente a la proteína expresada en la bacteria *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Proteína NPTII.

El gen *nptII* fue aislado del transposón bacteriano Tn5 (Beck *et al.*, 1982). Este gen codifica para la expresión de la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII), la cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglicosídicos kanamicina y neomicina. La enzima NPTII usa el ATP para fosforilar la neomicina y la kanamicina e inactiva el antibiótico evitando su efecto en las células que producen la proteína NPTII. La proteína NPTII está ampliamente distribuida en el ambiente y las cadenas alimenticias en microorganismos resistentes a la kanamicina que se encuentran de manera natural en el suelo y en los sistemas digestivos de los mamíferos (Flavell *et al.*, 1992). La expresión del gen *nptII*, presente en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y otros eventos de generaciones previas como Bollgard® (MON 531) y Bollgard®II (MON 15985), está controlada por el promotor CaMV 35S (Odell *et al.*, 1985). La secuencia de terminación transcripcional del RNAm proviene de la región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (*nos*) del plásmido pTiT37 de la cepa T37 de *A. tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982). El gen *nptII* funciona como marcador selectivo en las primeras fases de selección de células transformadas de algodón en el laboratorio (De Block *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1984), permitiendo a las células modificadas desarrollarse en un medio de cultivo selectivo. En la Figura 18 se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína NPTII.

Proteína AAD.

El gen de resistencia a antibióticos *aad* fue aislado del transposón bacteriano Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomycinina (Davies y Benveniste, 1974). Este gen codifica la expresión de la enzima 3'(9)-O-aminoglicósido adenililtransferasa (AAD) y está bajo el control de su propio promotor bacteriano. El gen *aad* no se expresa en las plantas de algodón biotecnológico debido a que su promotor bacteriano no es activo en plantas y los elementos reguladores necesarios para su expresión en las plantas no fueron adicionados a la construcción. El gen *aad* fue usado en el laboratorio, en la fase previa la transformación genética de las células de algodón, para seleccionar las bacterias que contenían el plásmido con el DNA de interés. En la Figura 19 se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína AAD.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

```
1 MDNNPHINEC IPYNCLSNPE VEVLGGERIE TGYTPIDISL SLTQFLLSEF
51 VPGAGFVLGL VDIINGIFGP SQWDAFLVQI EQLINQRIE PARNQAISRL
101 EGLSNLYQIY AESPREWEAD PTNPALREEM RIQFNDMNSA LTTAIFLFAV
151 QNYQVPLLSV YVQAANLHLS VLRDVSVFGQ RWGFDAATIN SRYNDLTRLI
201 GNYTDHAVRW YNTGLERVWG PDSRDWIRYN QFRRELTIV LDIIVSLFPHY
251 DSRTYPIRTV SQLTREIYTN PVLENFDGSP RGSAGGIEGS IRSPHLMNIL
301 NSITIIYTDH RGEYYWSGHQ IMASPVGFSG PEPTFFLYGT MGNAAPQORI
351 VAQLGQGVYR TLSSTLYRRP FNIGINNQQL SVLDGTEFAY GTSNNLPSAV
401 YRKSGTVDSL DEIPPQNNNV PPRQGFSHRL SHVSMFRSGF SNSSVSIIRA
451 PMPSWIHRSA EFNIIASDS ITQIPAVKGN FLFNGSVISG PGFTGGDLVR
501 LNSSGNNIQN RGYIEVPIHF PSTSTRYRVR VRYASVTFIH LNVNWNSSSI
551 FSNTVPATAT SLDNLQSSDF GYFESANAFT SSLGNIVGVR NPSGTAGVII
601 DRPEFIPVTA TLEAEYNLER AQKAVNALPT STNQLGLKTN VTDYHIDQVS
651 NLVTYLSDEF CLDEKRELSE KVKHAKRLSD ERNLLQDSNF KDINRQPERG
701 WGGSTGITIQ GGDDVPKENY VTLSGTFDEC YPTYLYQKID ESKLKAFTRY
751 QLRGYIEDSQ DLEIYSIRYN AKHETVNVPG TGSLWPLSAQ SPIGKCGEPN
801 RCAPHLEWNP DLDCSCRDGE KCAHSHHPS LDIDVGCTDL NEDLGWVVIP
851 KIKTQDGHAR LGNLEFLEEK PLVGEALARV KRAEKKWRDK REKLEWETNI
901 VYKEAKESVD ALFVNSQYDQ LQADTNAMI HAADKRVHSI REAYLPESV
951 IPGVNAAIFE ELEGRIFTAF SLYDARNVIK NGDFNQLSC WNVKGVHDVE
1001 EQNNQRSVLV VPEWAEVVSQ EVRVCPRGY ILRVTAYKEG YGEGCVTIE
1051 IENNTDELKP SNCVEEIIYP NNTVTCNDYT VNQEYGGAY TSNRQYNEA
1101 PSVPADYASV YEEKSYTDGR RENPCEPNRG YRDYTPLPVG YVTKLEYFP
1151 ETDKVVIEIG ETEGTFIVDS VELLME
```

Figura 17. Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ac.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

```
1  MIEQDGLHAG SPAAWVERLF GYDWAQQTIG CSDAAVFRLS AQGRPVLVFK
51  TDLSGALNEL QDEAARLSWL ATTVPCAAV LDVVTEAGRD WLLLGEVPGQ
101 DLLSSHLLAPA EKVSIMADAM RRLHTLDPAT CFPDHQAKHR IERARTRMEA
151 GLVDQDDLDE EHQGLAPAEI FARLKARMPD GEDLVVTHGD ACLPNIMVEN
201 GRFSGFIDCG RLGVADRYQD IALATRDIAE ELGGEWADRF LVLYGIAAPD
251 SQRIAFYRLL DEFF
```

Figura 18. Secuencia de aminoácidos de la proteína neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII).

```
1  MREAVIAEVS TQLSEVVGVI ERHLEPTLLA VHLYGSAVDG GLKPHSDIDL
51  LVTVTVRLDE TTRRALINDL LETSASPGES EILRAVEVTI VVHDDIIPWR
101 YPAKRELQFG EWQRNDILAG IPEPATIDID LAILLTKARE HSVLVGPAA
151 EELFDPVPEQ DLFEALNETL TLWNSPPDWA GDERNVVLTSL SRIWYSAVTC
201 KIAPKDVAAD WAMERLPAQY QPVILEARQA YLGQEDRLAS RADQLEEFVH
251 YVKGEITKVV GK
```

Figura 19. Secuencia de aminoácidos de la proteína AAD.

Proteína Cry2Ab.

El gen *cry2Ab* es una versión sintética mejorada del gen nativo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. La modificación fue necesaria para proveer secuencias controladoras que permitieran una mejor expresión del gen en las plantas de algodón. El gen *cry2Ab* con su región promotora fue clonado dentro de *B. thuringiensis* cepa EG7699. El producto de la expresión del gen *cry2Ab* fue aislado y purificado de la cepa bacteriana modificada EG7699. La proteína Cry2Ab (GenBank No. Acceso X55416) tiene una longitud de 633 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 71 kDa (Widner y Whiteley, 1990; Dankocsik *et al.*, 1990). La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry2Ab expresada por el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se presenta en la Figura 20.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

1	MAQVSRICNG	VQNPSLISNL	SKSSQRKSP	SVSLKTQQHP	RAYPISSSWG
51	LKKSGMTLIG	SELRPLKVM	SVSTACMLAM	DNSVLNSGRT	TICDAYNVAA
101	HDPFSFQHK	LDTVQKEWTE	WKKNNHSLYL	DPIVGTVASF	LLKKVGSVLG
151	KRILSELRNL	IFPSGSTNLM	QDILRETEKF	LNQRLNTDTL	ARVNAELTGL
201	QANVEEFNRQ	VDNFLNPNRN	AVPLSITSSV	NTMQQLFLNR	LPQFQMGOYQ
251	LLLLPLFAQA	ANLHLSFIRD	VILNADEWGI	SAATLRTYRD	YLKNYTRDYS
301	NYCINTYQSA	FKGLNTRLHD	MLEFRTYMFL	NVFEYVSIWS	LFKYQSLLV
351	SGANLYASGS	GPQQTQSFTS	QDWPFLYSLF	QVNSNYVLNG	FSGARLSNTF
401	PNIVGLPGST	TTHALLAARV	NYSGGISSGD	IGASPFNQNF	NCSTFLPPLL
451	TPFVRSWLDS	GSDREGVATV	TNWQTESFET	TLGLRSGAFT	ARGNSNYFPD
501	YFIRNISGVP	LVRNEDLRR	PLHYNEIRNI	ASPSGTPGGA	RAYMVSVHNR
551	KNNIHAVHEN	GSMIHLAPND	YTGFTISPIH	ATQVNNQTRT	FISEKFGNQG
601	DSLRFEQNNT	TARYTLRGNG	NSYNLYLRVS	SIGNSTIRVT	INGRVYTATN
651	VNTTTNNDGV	NDNGARFSDI	NIGNVVASSN	SDVPLDINVT	LNSGTQFDLM
701	NIMLVPTNIS	PLY			

Figura 20. Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry2Ab.

Proteína GUS.

El desarrollo de variedades de plantas que contienen nuevas características, introducidas por medio de ingeniería genética, depende de la existencia de medios eficaces para seleccionar las células transformadas que contengan el o los genes de interés insertados, de aquellas células que fallen o tomen o mantengan el ADN agregado. Por lo tanto, se utiliza un marcador rastreable para identificar las células que serán utilizadas en el proceso de regeneración. El gen de la β-glucuronidasa, *uidA*, también conocido como *gus* o gen *gusA*, se deriva de la bacteria *E. coli* cepa K12 (Jefferson *et al.*, 1986). Su secuencia se ha caracterizado y está disponible en el GenBank (Jefferson *et al.*, 1986; Schlaman *et al.*, 1994). Este gen codifica para la enzima β -D glucuronidasa (GUS).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

La β -D-glucuronidasa es una exohidrolasa que cataliza la hidrólisis de una gama de β -glucurónidos en sus ácidos correspondientes y los aglicones (Oshima *et al.*, 1987), incluyendo el sustrato artificial p-nitrofenil- β -D-glucurónido. La hidrólisis de este compuesto cromogénico artificial libera un tinte azul que funciona como un marcador visible y cuantificable en los procesos de transformación de la planta (Jefferson *et al.*, 1986). La actividad bioquímica y catalítica de esta proteína ha sido estudiada a fondo (Wang y Touster, 1972). La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GUS según se expresa en el evento de algodón MON-15985 se presenta en la Figura 21.

1	MVRPVETPTR	EIKKLDGLWA	FSLDRENCGI	DQRWVESALQ	ESRAIAVPGS
51	FNDQFADADI	RNYAGNVWYQ	REVFIPKGWA	GQRIVLRFDA	VTHYGKVVVN
101	NQEVMEHQGG	YTPFEADVTP	YVIAGKSVRI	TVCVNNELNW	QTIPPGMVIT
151	DENGKKKQSY	FHDFFNAGI	HRSVMLYTPP	NTWVDDITVV	THVAQDCNHA
201	SVDWQVVANG	DVSVELRDAD	QQVVATGQGT	SGTLQVVNPH	LWQPGEGYLY
251	ELCVTAKSQT	ECDIYPLRVG	IRSVAVKGEQ	FLINHKKPFYF	TGFGRHEDAD
301	LRGKGFNDVL	MVHDHALMDW	IGANSYRTSH	YPYAEEMLDW	ADEHGIVVID
351	ETAAVGFNLS	LGIGFEAGNK	PKELYSEEAV	NGETQQAHLQ	AIKELIARDK
401	NHPSVVMWSI	ANEPDTRPQA	AREYFAPLAE	ATRKLDPTRP	ITCVNVMFCD
451	AHTDTISDLF	DVLCLNRYYG	WYVQSGDLET	AEKVLEKELL	AWQEKLHQPI
501	IITEYGVDTL	AGLHSMYTD	WSEEQCAWL	DMYHRVFDV	SAVVGEQVWN
551	FADFATSQGI	LRVGGNKKGI	FTRDRKPKSA	AFLQKRWTG	MNFGEKPPQG
601	GKQ				

Figura 21. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GUS.

Proteína Vip3A.

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando el vector binario pCOT-1, para introducir el gen *vip3A(a)* que codifica la proteína insecticida Vip3A y la proteína APH4, utilizada como marcador selectivo.

Para información detallada sobre la secuencia de aminoácidos de las proteínas Vip3A y APH4, consultar la información del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Proteína CP4 EPSPS.

El gen *cp4 epsps* que confiere tolerancia al glifosato [N-(fosfometil) glicina], ingrediente activo de los herbicidas de la familia Faena[®], fue aislado de la bacteria *A. tumefaciens*. cepa CP4. La enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) es una enzima crítica en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que cataliza la adición de enolpiruvil a partir de fosfoenolpiruvil al shikimato-3-fosfato. La enzima EPSPS es esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos y casi todos los compuestos aromáticos en las plantas, bacterias, algas y hongos, pero está ausente en mamíferos (Bentley, 1990; Eschenburg *et al.*, 2002). La inhibición de la enzima EPSPS por el glifosato bloquea esta ruta metabólica, lo cual eventualmente provoca la muerte de la célula (Steinrücken y Amrhein, 1980). La proteína CP4 EPSPS es naturalmente insensible al glifosato (Padgett *et al.*, 1993) tal como otras enzimas EPSPS microbianas (Schulz *et al.*, 1985; Eschenburg *et al.*, 2002).

La secuencia codificante del gen *cp4 epsps* fue modificada por mutagénesis dirigida para obtener una expresión óptima en plantas (Padgett *et al.*, 1993). El gen nativo *cp4 epsps* contiene secuencias que podrían ser desfavorables para una expresión alta en algunas plantas. Estas secuencias incluyen sitios potenciales de poliadenilación que generalmente son ricas en A+T, un porcentaje alto de G+C del que comúnmente se encuentra en los genes de plantas dicotiledóneas (63% contra ~50%), regiones concentradas de residuos de G y C, y codones que no son de uso frecuente en los genes de las plantas dicotiledóneas. Se sintetizó una versión del gen con uso de codones preferenciales por la planta, que fue utilizada en el vector de transformación del algodón. Esta secuencia codificante fue expresada en *E. coli* con el vector *PRecA 10L* y la actividad de la enzima EPSPS se comparó con la producida a partir del gen nativo *cp4 epsps* de *A. tumefaciens*. Los resultados establecieron que, aunque la secuencia del gen fue modificada, la enzima producida por el gen modificado presenta exactamente la misma secuencia de aminoácidos que la enzima producida por *A. tumefaciens*, asimismo, su actividad también permanece inalterada.

El promotor que controla la expresión del gen *cp4 epsps* es el promotor CMoVb (promotor 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia*) (Richins *et al.*, 1987; Gowda *et al.*, 1989; Sanger *et al.*, 1990). El promotor está unido a la región codificante del péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) del gen *epsps* de *A. thaliana* (Klee *et al.*, 1987). El CTP dirige la enzima EPSPS al cloroplasto que es el sitio de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. En las plantas, la enzima EPSPS es sintetizada como una preproteína (p.e. conteniendo el CTP) por ribosomas libres en el citoplasma celular. El precursor es transportado al interior del estroma del cloroplasto y es procesado proteolíticamente para producir la enzima madura (della-Cioppa *et al.*, 1986). Una vez desprendido, el péptido de transferencia al cloroplasto se degrada rápidamente (Bartlett *et al.*, 1982; della-Cioppa *et al.*, 1986).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

La secuencia de terminación transcripcional del RNAm proviene de la región 3' no traducida del gen de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (*rbcS*) *E9* del chícharo (*Pisum sativum*) para controlar la terminación transcripcional y la poliadenilación del gen *cp4 epsps* (Coruzzi *et al.*, 1984).

La proteína CP4 EPSPS se detectó mediante análisis de Western blot (reconocimiento de proteínas mediante anticuerpos específicos) en extractos de proteína de semilla de algodón Roundup Ready®. Un anticuerpo específico para la proteína CP4 EPSPS reaccionó con una proteína de 48 kD, el peso molecular esperado para la proteína menos el CTP, confirmando que este péptido es cortado durante el proceso de transporte al cloroplasto. En la Figura 22 se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS.

1	MLHGASSRPA	TARKSSGLSG	TVRIPGDKSI	SHRSFMFGGL	ASGETRITGL
51	LEGEDVINTG	KAMQAMGARI	RKEGDTWIID	GVGNGLLAP	EAPLDFGNAA
101	TGCRLTMGLV	GVYDFDSTFI	GDASLTKRPM	GRVLNPLREM	GVQVKSEGD
151	RLPVTLRGPK	TPTPITYRVP	MASAQVKS AV	LLAGLNTPGI	TTVIEPIMTR
201	DHTEKMLQGF	GANLTVETDA	DGVRTIRLEG	RGKLTGQVID	VPGDPSSTAF
251	PLVAALLVPG	SDVTILNVLM	NPTRTGLILT	LQEMGADIEV	INPRLAGGED
301	VADLRVRSST	LKGVTVPEDR	APSMIDEYPI	LAVAAFAEG	ATVMNGLEEL
351	RVKESDRLSA	VANGLKLVGV	DCDEGETSLV	VRGRPDGKGL	GNASGAAVAT
401	HLDHRIAMSF	LVMGLVSENP	VTVDDATMIA	TSFPEFMDLM	AGLGAKIELS
451	DTKAA				

Figura 22. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS.

Proteína DMO.

La DMO es una enzima que cataliza la demetilación del dicamba al compuesto no-herbicida DCSA y formaldehído (Chakraborty *et al.*, 2005). Esta proteína está dirigida al cloroplasto para su localización en conjunto con las enzimas endógenas reductasa y ferredoxina que surten de electrones para la reacción de demetilación de la proteína DMO descrita por Behrens *et al.* (2007). En la construcción del vector plásmido utilizado en el desarrollo del evento MON 88701, PV-GHHT6997, se unió una secuencia de un péptido de tránsito (CTP2) a la secuencia del gen *dmo*. La inclusión de esta secuencia codificante produce una proteína precursora que consiste en la proteína DMO y 76 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de la proteína. Estos aminoácidos adicionales corresponden al péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) de la proteína EPSPS de *A. thaliana*, que se incorporó para mejorar la señalización de la proteína precursora al cloroplasto (Herman, 1995; Klee *et al.*, 1987).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Se dedujo la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora DMO (Figura 23) expresada por el evento MON 88701 de la secuencia codificante completa presente en el vector PV-GHHT6997 (Tabla 6, Figura 8). El péptido de tránsito al cloroplasto (CTP2), guía a la proteína DMO al cloroplasto y los primeros 76 aminoácidos del precursor están resaltados en la Figura 23. Este CTP2 se corta en el cloroplasto para producir la proteína DMO madura de 349 aminoácidos que empieza con una valina en la posición 68. El doble subrayado muestra los nueve aminoácidos del CTP2 localizados en el extremo N-terminal de la proteína DMO madura.

1	<u>MAQ</u> <u>VS</u> <u>RIC</u> <u>NG</u>	<u>VQN</u> <u>PS</u> <u>LIS</u> <u>NL</u>	<u>SKSS</u> <u>QR</u> <u>KS</u> <u>SPL</u>	<u>SVSL</u> <u>KT</u> <u>QQ</u> <u>HP</u>	<u>RAY</u> <u>PI</u> <u>SS</u> <u>SWG</u>
51	<u>LKK</u> <u>SG</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>G</u>	<u>SEL</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>S</u>	<u>SV</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u>	<u>VR</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u>	<u>PE</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>G</u>
101	<u>RT</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u>	<u>YR</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>LL</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>A</u>	<u>PL</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>G</u>	<u>HL</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u>
151	<u>FD</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>N</u>	<u>PH</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>S</u>	<u>LN</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>E</u>	<u>RD</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>G</u>	<u>DP</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u>
201	<u>PD</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>A</u>	<u>YR</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>V</u>	<u>DC</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>N</u>	<u>LM</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>V</u>	<u>HR</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>F</u>
251	<u>DR</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>G</u>	<u>DG</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>I</u>	<u>PG</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>A</u>	<u>KF</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>V</u>	<u>DA</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>K</u>
301	<u>VS</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u>	<u>AP</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>S</u>	<u>IH</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>T</u>	<u>PET</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>F</u>	<u>FG</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>D</u>
351	<u>DP</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u>	<u>WQ</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>D</u>	<u>KV</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u>	<u>RAY</u> <u>VE</u> <u>AN</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>R</u>	<u>PAM</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u>
401	<u>VR</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>L</u>	<u>EQ</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u>			

Figura 23. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína DMO.**Proteína PAT.**

La proteína PAT de ~21 kDa que consiste en un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT en el evento MON 88701 confiere tolerancia a glufosinato. La proteína PAT producida en el evento MON 88701 proviene del gen *bar*. El análisis de extractos de semilla de algodón MON 88701 determinó que la proteína expresada correspondía del polipéptido de 183 aminoácidos, resultando en una proteína de 24.1 kDa (Figura 24). La actividad de la proteína PAT purificada de semilla de algodón MON 88701 se confirmó durante su caracterización.

1	<u>MSP</u> <u>ERR</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u>	<u>RR</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>A</u>	<u>VCT</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>E</u>	<u>TST</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>P</u>	<u>QEP</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>L</u>
51	<u>VRL</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>L</u>	<u>VA</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u>	<u>IAY</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>R</u>	<u>NAY</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>T</u>	<u>VY</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>T</u>
101	<u>GL</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>L</u>	<u>LKS</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u>	<u>SV</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>N</u>	<u>DPS</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u>	<u>GY</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>A</u>
151	<u>AG</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>D</u>	<u>VG</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>L</u>	<u>PV</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>V</u>	<u>TE</u> <u>I</u>	

Figura 24. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína PAT.

I.n. Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgén y sus cambios.

mCry51Aa2.

El modo de acción de la proteína mCry51Aa2 está bien caracterizada experimentalmente y sigue los mismos pasos generales que otras proteínas Cry derivadas de Bt, incluyendo Cry1, Cry2 y Cry3 (Jerga *et al.*, 2016). El modo de acción insecticida de las proteínas Bt, en general, requiere de la ingestión por el insecto, activación proteolítica (que convierte la forma de protoxina inactiva de la proteína Bt a la forma activa de la toxina), unión a receptores de membrana en el intestino medio del insecto, oligomerización en membrana y formación de poros en la membrana de las células, lo que lleva a la muerte del insecto (Gill *et al.*, 1992; OECD, 2007; Pigott y Ellar, 2007; Schnepf *et al.*, 1998; Vachon *et al.*, 2012). Cualquiera de estos pasos puede definir la especificidad de las proteínas Bt, dado que la inhabilidad de una proteína de comportarse correctamente la dejará inactiva para el insecto.

Cry1Ac.

La proteína Cry1Ac, producida en el evento MON 531 es 99.4% idéntica a la proteína producida por *Bt*, cepa HD-73. El modo de acción de las proteínas Cry empieza con la ingestión por el insecto para ejercer actividad insecticida. La proteína en su forma cristalina es insoluble en solución acuosa a pH neutral o ácido (Bulla *et al.*, 1977), sin embargo, el pH del tracto digestivo de las larvas de los insectos es alcalino, lo que favorece la solubilización del cristal. Ésta es subsecuentemente activada por proteasas en el tracto del insecto. Estas proteasas cortan el extremo carboxilo terminal del resto de la proteína, al igual que aproximadamente 28 aminoácidos del extremo amino terminal. La proteína activada, que consiste en aproximadamente 660 aminoácidos, se difunde a través de la membrana peritrófica del insecto al epitelio del mesenterón. Aquí se une a receptores específicos de alta afinidad (Wolfersberger *et al.*, 1986, Hofmann *et al.*, 1988, Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990). Se forman poros en la membrana que causa derramamiento de los contenidos celulares (i. e. K⁺) en el lumen del intestino y agua hacia las células epiteliales de intestino (Sacchi *et al.*, 1986). Las células epiteliales del tracto de las larvas se hinchan debido a la presión osmótica y se lisan. El tracto se paraliza como consecuencia de los cambios en electrolitos y pH lo que provoca que la larva deje de comer y muera.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Cry2Ab.

La bacteria *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* es una bacteria Gram positiva formadora de esporas cristalinas que se encuentra de forma natural en el suelo y se ha usado comercialmente los últimos 40 años para el control de insectos plaga (EPA, 1988). Hay productos comerciales para controlar plagas que contienen los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*. El gen *cry2Aa* se expresa en estos productos comerciales; sin embargo, el gen *cry2Ab* es un pseudogén que, aunque presente, no se expresa debido a un promotor ineficiente (Dankocsik *et al.*, 1990). Por lo tanto, la proteína Cry2Ab no se expresa naturalmente en bacterias del suelo o preparaciones microbianas para aplicación en campo (Widner y Whiteley, 1990; Crickmore *et al.*, 1994). Los dos genes, *cry2Aa* y *cry2Ab*, se localizan en el mismo plásmido de 100 MDa (Donovan *et al.*, 1988; 1989) y la secuencia del gen *cry2Ab* se ha caracterizado completamente (Widner y Whiteley, 1990).

Como el gen *cry2Ab* no se expresa naturalmente en *Bt*, como se describe en el párrafo anterior, se clonó el pseudogén *cry2Ab* con un promotor adecuado en la cepa EG7699 de *Bt*. Posteriormente se aisló y purificó la proteína Cry2Ab, que contiene 633 aminoácidos con una masa aproximada de 71 kDa (Widner y Whiteley, 1990; Dankocsik *et al.*, 1990). Se insertó un aminoácido adicional (posición 2) para crear un sitio de corte para una enzima de restricción para facilitar la clonación. Los productos proteicos de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* comparten un 88% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Widner y Whiteley, 1990; Dankocsik *et al.*, 1990) y 97% de similitud (identidad de aminoácidos). Además, hay una predicción de que la proteína Cry2Ab producida en las plantas transgénicas de algodón contiene tres aminoácidos debido a procesamiento del péptido de tránsito al cloroplasto.

El modo de acción de la proteína Cry2Ab es similar al de la proteína Cry1Ac. Comienza con la ingestión por el insecto blanco, en el intestino se solubiliza y se procesa (se corta el dominio carboxilo terminal) por proteasas para originar la proteína madura. La proteína activa se difunde por la membrana peritrófica de las células epiteliales en el intestino del insecto donde se une a receptores específicos y se forman poros por donde se difunden iones. Esto lleva al drenado de los contenidos celulares e hinchazón de las células. Las larvas se paralizan y dejan de comer y mueren.

Al igual que Cry1Ac, la proteína Cry2Ab es selectiva para lepidópteros debido a los receptores que éstos tienen en la membrana de las células epiteliales del intestino. Otros organismos como insectos de otros órdenes, mamíferos, aves y peces no tienen estos receptores, por lo tanto, la proteína Cry2Ab es completamente inofensiva para ellos.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Vip3A.

El efecto planeado de la modificación genética del algodón con el evento COT102 que incorpora el gen *vip3A(a)* de *Bt* y expresa la proteína insecticida Vip3A es conferir al algodón resistencia a especies de insectos lepidópteros. Syngenta declara que las plantas que expresan la proteína Vip3A tienen resistencia a varias especies de lepidópteros incluyendo, pero no limitándose a gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), tabacalero (*Heliothis virescens*), rosado (*Pectinophora gossypiella*), cogollero (*Spodoptera frugiperda*), soldado (*Spodoptera exigua*), defoliador de la soya (*Pseudoplusia includens*), falso medidor (*Trichoplusia ni*) y perforador de la hoja (*Bucculatrix thurberiella*).

Para información detallada sobre las rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgén y sus cambios, consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto de Monsanto.

CP4 EPSPS.

La proteína CP4 EPSPS de *A. tumefaciens* es una enzima que está presente en los algodones genéticamente modificados (GM) que contienen alguna de las tecnologías Solución Faena® (MON 1445) y Solución Faena Flex® (MON 88913), incluyendo MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Esta proteína les confiere la característica de tolerancia al herbicida no selectivo glifosato y participa dentro de la ruta metabólica de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, al igual que el resto de las EPSPS de todas las plantas. Sin embargo, a diferencia de las demás, CP4 EPSPS de *A. tumefaciens* es naturalmente resistente a glifosato (Duke, 1988). Esto se debe a un sitio activo reducido donde el glifosato no encaja. De esta manera, la proteína permanece funcional en presencia del herbicida y conserva activa la producción de aminoácidos aromáticos esenciales para la vida de la planta.

La proteína CP4 EPSPS se exporta a los cloroplastos, el sitio de síntesis de aminoácidos aromáticos, vía fusión N-terminal con un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP2), para formar el precursor CTP2-CP4. La proteína precursora producida en el citoplasma se procesa para remover el péptido de tránsito al ser translocada al cloroplasto, lo que resulta en la proteína CP4 EPSPS madura y funcional.

Se sintetizó una versión del gen que utiliza codones con mayor afinidad por las polimerasas vegetales y se insertó en los vectores utilizados para la transformación del algodón. Esta secuencia codificante se expresó en *E. coli* y la actividad de la proteína EPSPS se comparó con la de la proteína nativa. Los resultados demostraron que la enzima expresada a partir del

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

gen sintético permanecía inalterada. La identidad de la proteína producida *in planta* se confirmó usando análisis de Western blot y análisis de secuencia N-terminal. En base al Western blot se encontró que la movilidad electroforética y las propiedades inmunorreactivas de la proteína aislada del algodón GM eran equivalentes a las de la proteína de referencia EPSPS producida en *E. coli*.

DMO.

La proteína DMO es una enzima monooxigenasa que cataliza la demetilación del dicamba al compuesto no-herbicida ácido 3,6-diclorosalicílico (DCSA) y formaldehído (Chakraborty *et al.*, 2005). Las monooxigenasas son enzimas que incorporan un átomo de oxígeno como un grupo hidroxilo con la producción concomitante de agua y la oxidación de la nicotinamida adenin dinucleótido (NADH) (Harayama *et al.*, 1992) y se encuentran en diferentes *phylum* desde bacterias a plantas (Ferraro *et al.*, 2005; D'Ordine *et al.*, 2009; Herman *et al.*, 2005). Se requiere la formación de un trímero porque el transporte de electrones que culmina con la demetilación del dicamba ocurre de un monómero a otro en la conformación nativa de la enzima (D'Ordine *et al.*, 2009).

La DMO nativa se purificó inicialmente de *S. maltophilia* cepa DI-6, que se aisló del suelo en una planta de manufactura de dicamba (Krueger *et al.*, 1989). La DMO es una proteína oxigenasa férrica tipo-Rieske no-heme, que es parte de un sistema de tres componentes compuesto por una reductasa, una ferredoxina y una oxigenasa terminal, en este caso la DMO (Figura 25). Estas tres proteínas trabajan juntas en un sistema redox similar a muchas otras oxigenasas que transportan electrones de la nicotinamida adenin dinucleótido (NADH) al oxígeno y catalizan la demetilación de un sustrato aceptor de electrones, en este caso dicamba (Behrens *et al.*, 2007).

La estructura cristalográfica de la DMO fue determinada como un trímero compuesto de tres monómeros de DMO idénticos (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009). Cada monómero contiene un dominio cluster Rieske [2Fe-2S] y un dominio central férrico no-heme (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009) que son típicos de las monooxigenasas tipo-Rieske y son los dominios clave involucrados en el transporte de electrones (Ferraro *et al.*, 2005). Se caracterizó el sitio catalítico en cada monómero para determinar el acomodo de dicamba en el sitio e hipotetizar el mecanismo de reacción de demetilación de dicamba (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

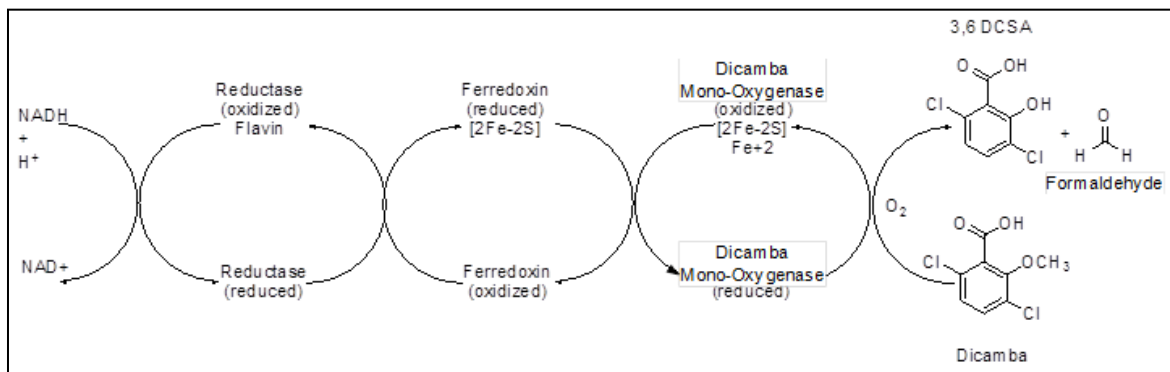


Figura 25. Componentes del sistema redox de DMO.

La estructura cuaternaria trimérica de la DMO fue la forma nativa de la enzima observada durante la cristalización y se requiere para el transporte de electrones y catálisis (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009). Para catalizar la demetilación de dicamba, los electrones transferidos desde el NADH se transportan a través de una reductasa y una ferredoxina a la DMO oxigenasa terminal (Figura 25). Los electrones se reciben de la ferredoxina por el cluster Rieske [2Fe-2S] en una de los monómeros de DMO del trímero y se transfieren al sitio catalítico de un monómero adyacente (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009), donde activa reductoramente al oxígeno para catalizar la demetilación final de dicamba. Para que esta transferencia de electrones suceda entre monómeros adyacentes de DMO, se requiere una estructura trimérica con espaciamiento preciso y orientación entre los tres monómeros (D'Ordine *et al.*, 2009). El transporte de electrones desde el dominio clúster Rieske [2Fe-2S] al dominio central no-heme no puede ocurrir en un mismo monómero ya que la distancia es muy amplia (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009).

Por lo tanto, para que las plantas de algodón sean tolerantes a dicamba, se debe formar una proteína DMO trimérica funcional. La forma activa trimérica de la DMO, tal como fue purificada del evento MON 88701, confiere tolerancia a dicamba, y su actividad demetilasa sobre el dicamba se confirmó durante la caracterización, apoyando la conclusión de que el trímero requerido para la actividad funcional se formó en el evento MON 88701.

Se evaluó la especificidad de sustrato para la proteína DMO para comprender las posibles interacciones que pudiera tener con sustratos potenciales presentes en el algodón MON 88701. La literatura indica que la especificidad de la DMO para dicamba se debe a las interacciones específicas que ocurren en el sitio catalítico (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009). El dicamba interacciona con aminoácidos en el sitio catalítico de la DMO a través de la parte carboxílica y los átomos de cloro de dicamba, que están involucrados principalmente en la orientación del sustrato en el sitio catalítico. Estos átomos de cloro son necesarios para la

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

catálisis (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009). Dada la limitada existencia de compuestos clorados con estructuras similares a dicamba en plantas y otros eucariotas (Wishart, 2010; Wishart *et al.*, 2009), es poco probable que la DMO catalice la conversión de otros sustratos endógenos.

El potencial para que DMO metabolice sustratos endógenos de la planta fue evaluado en experimentos *in vitro* utilizando una proteína DMO purificada, con cola de histidinas en su extremo N-terminal, idéntica a la DMO nativa, excepto por la cola de histidinas usada para ayudar en su purificación. Se seleccionaron sustratos endógenos potenciales para su evaluación basada en la similitud estructural de los compuestos al dicamba y su presencia en algodón, maíz y soya (Buchanan *et al.*, 2000; Janas *et al.*, 2000; Lege *et al.*, 1995; Schmelz *et al.*, 2003). Los sustratos potenciales analizados fueron ácido *o*-anísico (ácido 2-metoxibenzoico), ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico), ácido siríngico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico), ácido ferúlico (ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propil-2-enoico) y ácido sinápico (ácido 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) propil-2-enoico) (Figura 26). La mezcla del ensayo incluyó NADH, reductasa, ferredoxina y DMO. Se utilizó dicamba como control positivo para demostrar que el sistema del ensayo era funcional. Se monitoreó la desaparición de los sustratos potenciales y la formación de productos de oxidación potenciales utilizando Cromatografía Líquida-Ultravioleta (LC-UV) y Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas (LC-MS). Ninguno de los sustratos analizados, excepto dicamba, fueron metabolizados por la DMO con cola de histidinas en estos experimentos *in vitro*. Para evaluar si la proteína DMO expresada en el evento MON 88701 tiene la misma especificidad que la DMO con cola de histidinas usada en los experimentos *in vitro*, se incubó la proteína DMO del MON 88701, cuya equivalente a la DMO nativa producida in planta, con ácido *o*-anísico, el compuesto endógeno que posee la mayor similitud estructural al dicamba. De nuevo se utilizó dicamba como control positivo para demostrar que el ensayo es funcional. Este análisis demostró que el ácido *o*-anísico no fue metabolizado por la DMO producida en *E. coli*, en cambio dicamba si fue metabolizado. Estos resultados indican que la DMO, incluyendo la proteína DMO codificada en el evento MON 88701, es específica para el sustrato dicamba (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

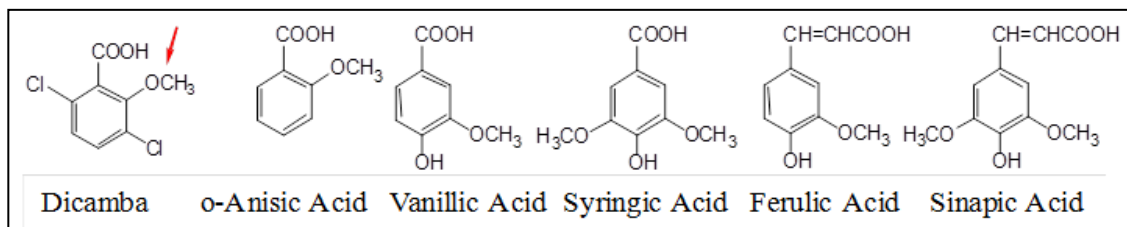


Figura 26. Dicamba y Sustratos endógenos potenciales analizados en experimentos *in vitro* con la proteína DMO.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

PAT.

El modo de acción de la proteína PAT se ha evaluado extensivamente y se ha clasificado como una acetiltransferasa que acetila el glufosinato para producir N-acetil glufosinato sin capacidad herbicida. El glufosinato es una mezcla racémica de formas D y L de fosfinotricina, aunque sólo la forma L tiene actividad herbicida. La actividad herbicida del glufosinato resulta de la unión de L-fosfinotricina a la glutamina sintetasa (OECD, 1999; 2002). La glutamina sintetasa es responsable de la asimilación del amoníaco durante la fotorrespiración. La unión de la L-fosfinotricina a la glutamina sintetasa resulta en la inactivación de la enzima y una acumulación tóxica de amoníaco dentro de la planta que desencadena la muerte de la planta (Manderscheid y Wild, 1986; OECD, 1999; 2002; Wild y Manderscheid, 1984).

La proteína PAT producida en el evento MON 88701 acetila el grupo amino libre de la forma L-fosfinotricina del glufosinato para producir N-acetil glufosinato sin actividad herbicida. El glufosinato acetilado no es capaz de unirse a la glutamina sintetasa y, por lo tanto, no interrumpe la fotorrespiración y evita la acumulación de amoníaco. Por lo tanto, la producción de la proteína PAT confiere tolerancia al glufosinato a través de este mecanismo.

Las proteínas PAT, incluyendo la PAT (*bar*), son altamente específicas para glufosinato en presencia de acetil-CoA (Thompson *et al.*, 1987; Wehrmann *et al.*, 1996). Mientras que la actividad herbicida del glufosinato viene de la forma L-aminoácido, otros L-aminoácidos no pueden ser acetilados por la proteína PAT, y los ensayos de competencia conteniendo glufosinato, concentraciones altas de otros aminoácidos y la proteína PAT no mostraron inhibición de la acetilación del glufosinato (Wehrmann *et al.*, 1996). Más aún, el L-glutamato, un análogo del glufosinato, tampoco mostró inhibición de la acetilación de glufosinato en ensayos de competencia (Wehrmann *et al.*, 1996). Además, la proteína PAT tiene una afinidad más de 30 veces mayor hacia la L-fosfinotricina que sobre otros análogos en plantas (Thompson *et al.*, 1987). Así, la proteína PAT tiene gran especificidad de sustrato por la L-fosfinotricina, el componente herbicida del glufosinato, y es poco probable que afecte el sistema metabólico del algodón MON 88701. Se han evaluado muchos productos con tolerancia al glufosinato incluyendo aquellos en algodón, maíz, soya, canola, remolacha y arroz sin identificar puntos que causen preocupación (ILSI-CERA, 2011) (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

I.o. Productos de degradación de la proteína codificada por el transgén en subproductos.

PROTEÍNAS mCry51Aa2, Cry1Ac y Cry2Ab.

El destino ambiental de proteínas Cry de *Bt* ha sido extensamente estudiado. La literatura publicada ha demostrado que la absorción de las proteínas *Bt* en el suelo es rápida y completa en un lapso de sólo 30 minutos (Venkateswerla y Stotzky, 1992). Asimismo, se han realizado numerosos estudios sobre la biodegradación y secuestro de las proteínas *Bt* (Tapp *et al.*, 1994; Tapp y Stotzky, 1995, 1998; Crecchio y Stotzky, 1998; Koskella y Stotzky, 1997). Todos estos estudios han demostrado que las proteínas *Bt* aisladas pueden unirse a partículas de arcilla y ácidos húmicos en mezclas artificiales de suelo. La EPA de Estados Unidos llevó a cabo una evaluación ambiental de las proteínas *Bt*, no encontrando impactos significativos (EPA, 1998). Se ha observado que los cristales de las proteínas *Bt* se degradan rápidamente en el campo debido al efecto de la radiación solar y de la temperatura (USDA, 1999).

Varios factores del suelo (p.e., pH y contenido de arcilla) pueden influenciar el ritmo de degradación de las proteínas Cry. Estudios publicados sugieren que las proteínas Cry se pueden unir a los componentes arcillosos del suelo y volverse más resistentes a la degradación por microorganismos del suelo (Fiorito *et al.*, 2008; Stotzky, 2004). Sin embargo, estudios de laboratorio y campo muestran que solo una muy pequeña fracción de proteínas Cry derivadas de residuos postcosecha persiste el tiempo suficiente para ser estabilizadas por coloides del suelo o minerales de arcilla (Hopkins y Gregorich, 2005). Adicionalmente, el pH del suelo, cerca o superior a la neutralidad, aumenta sustancialmente el ritmo de degradación de las proteínas Cry (Tapp y Stotzky, 1998). Se recomienda un pH de 5.8-8.0 para maximizar la disponibilidad de nutrientes para el cultivo de algodón. Algunos expertos aconsejan que si el pH del suelo baja de 5.2 o sube por encima de 8.5, esto puede ser detrimental para la producción de algodón (Advancing Cotton Education, 2017).

Se han realizado muchos estudios de degradación en suelo con proteínas Cry provenientes de una variedad de cultivos biotecnológicos (p.e., Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, Cry1F, Cry34/35); el peso de la evidencia indica que las proteínas Cry no persisten en el suelo (Herman *et al.*, 2002; Icoz y Stotzky, 2008a, b; Sims y Holden, 1996; Sims y Ream, 1997). Además, se han realizado varios estudios en campo para analizar la disipación de las proteínas Cry después de varios años de producción de algodón. Estos estudios han mostrado la no persistencia o acumulación de proteínas Cry en campos donde se cultivó algodón que expresaba la proteína Cry1Ac de manera continua por varios años (Head *et al.*, 2002).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

mCry51Aa2.

Los organismos del suelo podrían estar expuestos a la proteína mCry51Aa2 proveniente de algodón MON 88702 por contacto con las raíces o con biomasa de las plantas depositada o arada al suelo. Además, el alimentarse de biomasa muerta del cultivo o ingerir o absorber las proteínas Cry después de su liberación al suelo puede representar una ruta de exposición para organismos que habitan en el suelo.

Un estudio de degradación en suelo demostró que la proteína mCry51Aa2 expresada en MON 88702 se disipa rápidamente en diferentes suelos agrícolas representativos cuyo pH estuvo entre 5.7 y 7.1 y que contenían proporciones significativas de arcilla (hasta 36%) o materia orgánica (hasta 6.1%). Se añadieron una mezcla de proteína mCry51Aa2 purificada y tejido de raíz y tallo expresando la proteína mCry51Aa2 a cada suelo en exceso, relativo a la máxima concentración posible, bajo condiciones de cultivo de algodón. Se utilizaron niveles elevados de proteína mCry51Aa2 para mejorar la precisión de las cuantificaciones analíticas y para asegurar que la DT₅₀ y la DT₉₀ (tiempo al 50% y 90% de disipación de la proteína mCry51Aa2) se pudieran calcular a partir de valores medibles (p.e., por encima del límite de detección). El exceso de proteína mCry51Aa2 también aportó un margen de seguridad ambiental aumentado para incluir cualquier ruta de introducción de la proteína al suelo no prevista. Se analizaron las concentraciones de proteína mCry51Aa2 en los extractos de suelo utilizando ELISA. Los resultados indicaron una DT₅₀ máxima estimada de 4.7 días y una DT₉₀ máxima estimada de 74.5 días.

Estos resultados indican que la proteína mCry51Aa2 producida en el algodón MON 88702 no persistirá o se acumulará bajo condiciones de producción de algodón, indicando una exposición negligible para organismos no blanco y persistencia en el ambiente.

Cry1Ac.

Estudios de degradación en el suelo con la proteína Cry1Ac compararon la tasa de degradación de proteína pura versus proteína producida en tejido de algodón. Los resultados demostraron que la degradación en el suelo de la proteína producida en el tejido de algodón era un poco más lenta que en el caso de la proteína purificada. Basándose en estos resultados, los experimentos que se llevaron a cabo utilizaron sólo tejido de hoja liofilizado, que se anticipó proporcionaría el estimado más conservador de degradación en el suelo. Se consideró que la tasa exagerada de concentración provista en el suelo es suficiente para dar cuenta de todas las rutas potenciales de incorporación de las proteínas en el suelo, incluyendo la exudación si ello fuera a ocurrir. El estudio ya referenciado con la proteína Cry1Ac fue conducido utilizando una metodología similar de bioensayos de insectos para medir la actividad insecticida presente en el suelo. En efecto, se agregó proteína Cry1Ac o polvo de tejido de hoja de algodón liofilizada

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

que contenía la proteína Cry1Ac al suelo típico de las áreas de cultivo de algodón en Estados Unidos. Las muestras fueron incubadas a aproximadamente 24°C por hasta 54 días. La proteína Cry1Ac se disipó con una vida media estimada de 9.3 a 20.2 días. La proteína Cry1Ac agregada al suelo como componente de hojas de algodón en concentración de 0.01 g peso seco/g de suelo se disipó con una vida media de 41 días (Ream, 1994).

Finalmente, un estudio de suelo fue conducido en 1998 en seis localidades donde se había cultivado algodón MON 531 continuamente de 3 a 6 años consecutivos. Los niveles de actividad insecticida en el suelo de estos campos fueron determinados 3 meses después de la cosecha usando una metodología de incorporación a la dieta en bioensayos de insectos. Las muestras de algodón de estos campos eran representativas de todas las fuentes de carga de proteína, incluyendo tejidos de plantas y el potencial exudado de raíz. Los resultados de cada localidad mostraron que no había niveles detectables de actividad insecticida a un nivel de detección <20 ng/g (Head *et al.*, 2002).

Cry2Ab.

El reporte de degradación en suelos (Dubelman *et al.*, 2001) demuestra que la proteína Cry2Ab se degrada rápidamente en el suelo, al igual que otras proteínas Cry estudiadas. Se mezclaron hojas de algodón MON 15985 liofilizadas que contenían las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac con suelos arenosos típicamente encontrados en las zonas de cultivo del algodón en Estados Unidos. Las muestras fueron incubadas a aproximadamente 25°C por un lapso de hasta 56 días. La cantidad de actividad insecticida en el suelo fue evaluada mediante bioensayos de incorporación en la dieta de insectos. Se pudo estimar que la vida media de la actividad insecticida en el suelo era de 2.3 días y que el tiempo estimado de disipación para alcanzar el 90% de reducción de la concentración original (DT₉₀) era de 15 días. Estas tasas de disipación se encuentran dentro del rango de valores de disipación publicados para Cry1Ac en tejidos de algodón (2.2 – 40 días conforme a lo citado en el reporte). Aunque el método de bioensayo de insectos no puede distinguir entre la actividad biológica de cada una de las dos proteínas, sí se pudo determinar que no había virtualmente actividad alguna detectable en las 3 últimas muestras de incubación a 42, 49 y 56 días.

Cabe destacar que la dosis empleada en el estudio de degradación en el suelo realizado con algodón MON 15985 descrito anteriormente fue llevado a cabo a una tasa mucho mayor de tejido de hoja que lo que podría esperarse si la biomasa aérea fuera el único contribuyente al contenido de tejido en el suelo. Basados en la tasa de expresión más alta encontrada en los estudios de campo de 1998 de 49.4 µg de la proteína por gramo seco de hoja de algodón MON 15985 (Kolwyck *et al.*, 1999), se estima conservadoramente que el nivel de la proteína Cry2Ab agregada a las primeras 3 pulgadas de suelo en un campo típico de algodón con 60 mil plantas

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

por acre y un promedio de tejido seco de 238 g por planta sería de 2.29 µg de la proteína Cry2Ab por gramo de suelo seco. Las concentraciones en el suelo de la proteína Cry2Ab empleadas en el estudio anteriormente mencionado fueron dos veces mayores que las estimadas en el “peor escenario” estimado de contenido en el suelo. Esta alta concentración en el suelo provee una concentración de proteína inicial tal que las mediciones cuantitativas detectables del bioensayo de insectos pudieron obtenerse por varias semanas luego de la aplicación inicial al suelo para permitir el cálculo apropiado de las tasas de disipación (DT₅₀ y DT₉₀). Adicionalmente, el tejido de hoja de algodón MON 15985 fue mezclado de tal forma, que simulara una situación en que el total de la carga potencial llegara al suelo, nuevamente considerando el peor escenario posible.

Otras proteínas de *Bt*

Un estudio de degradación en el suelo conducido con la proteína Cry2Aa, que es muy similar a la proteína Cry2Ab, determinó que la vida media de dicha proteína en el suelo, basados en actividad biológica, era de entre 15.5 y 31.7 días para el laboratorio y el campo, respectivamente. Estos resultados demuestran que la proteína Cry2Aa, como componente de las partes de planta post cosecha, se disipa o degrada cuando la planta es cultivada en el campo. Debido al alto grado de similitud entre las proteínas homólogas Cry2Aa y Cry2Ab, se estima que es altamente probable que la proteína Cry2Ab también se disipe o degrade bajo condiciones convencionales de cultivo, en las cuales tanto el algodón como el maíz es incorporado al suelo mediante rastreos luego de la cosecha.

Una serie de estudios en maíz que expresa Cry1Ab, una proteína de la familia Cry1A, demostró que, a concentraciones ecológicamente relevantes, no hubo efectos adversos en la estructura de la comunidad microbiana medida mediante análisis de ácidos grasos fosfolípidos (Griffiths *et al.*, 2005; Birch *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2007). Los investigadores observaron que el efecto de maíz con contenido de proteína Cry era menor y dentro de la variación normal esperada en sistemas agrícolas (Griffiths *et al.*, 2005). Adicionalmente, otros estudios han demostrado que factores físicos como el tipo de suelo, la textura del suelo, la edad de la planta o la heterogeneidad del campo tienen un efecto mayor en la comunidad bacteriana de la rizósfera que la presencia de cultivos que contienen proteínas Cry (Blackwood y Buyer, 2004; Fang *et al.*, 2005; Baumgarte y Tebbe, 2005).

El peso de la evidencia de la literatura publicada sobre el destino y efectos de las proteínas Bt en el suelo, incluyendo las proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac y Cry2Ab, apoya la conclusión de que las proteínas Bt constituyen un riesgo despreciable a los microorganismos del suelo.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Vip3A

Para información detallada sobre los productos de degradación de la proteína Vip3A, consultar la información del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

CP4 EPSPS

No existe toxicidad asociada a esta familia de enzimas que presenta una larga historia de seguridad ambiental y alimenticia, ya que está presente de manera ubicua en la naturaleza y en la dieta humana y animal. Además de eso, ***las enzimas EPSPS no son conocidas por persistir en el ambiente*** o por afectar el fenotipo del organismo hospedero con propiedades negativas, como patogenicidad o potencial de desarrollo en plantas dañinas.

Harrison *et al.* (1996) demostró que la proteína CP4 EPSPS se degrada rápidamente en fluidos digestivos simulados. La vida media de esta proteína fue de menos de 15 segundos en el sistema gástrico y menos de 10 minutos en el sistema intestinal, basados en análisis de hibridación Western blot. Por lo tanto, si alguna de las proteínas CP4 EPSPS fuera a sobrevivir el sistema gástrico, sería rápidamente degradada en el intestino. Como comparativo, se estima que el 50% del alimento sólido se vacía del estómago humano en dos horas, mientras que el 50% del alimento líquido se vacía en aproximadamente en 25 minutos (Sleisenger y Fordtran, 1989). Basándonos en esta información, se espera que la proteína CP4 EPSPS se degrade rápidamente en el tracto digestivo de mamíferos.

Se realizaron experimentos posteriores para determinar la digestibilidad *in vitro* de la proteína CP4 EPSPS en fluido gástrico simulado (FGS). Como en el estudio de Harrison *et al.* (1996), la CP4 EPSPS se produjo y purificó de *E. coli*. La digestibilidad se analizó por tres métodos: SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS), análisis inmunológico Western blot y ensayo de actividad enzimática de la EPSPS.

Los resultados de estos experimentos demostraron que la proteína CP4 EPSPS madura, producida en *E. coli*, se digirió rápidamente después de la incubación en FGS. El método colorimétrico azul SDS-PAGE demostró que al menos el 98% de la proteína madura producida en *E. coli* se digirió en el FGS en 15 segundos. No se observaron bandas degeneradas debidas a la digestión. El análisis de Western blot confirmó que más del 96% de la proteína madura producida en *E. coli* se digirió en el FGS en menos de 15 segundos. De igual manera, se demostró que la actividad enzimática EPSPS se redujo a menos del 10% en 15 segundos de incubación de la proteína CP4 EPSPS en FGS.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

DMO.

La DMO es una enzima que cataliza la demetilación de dicamba al compuesto no herbicida ácido 3,6 dicloro salicílico (DCSA) y formaldehído (Chakraborty *et al.*, 2005). EL DCSA es un metabolito del dicamba presente en algodón, soya, ganado y del suelo cuya seguridad se ha evaluado y se ha presumido como segura por la EPA (EPA, 2009). El formaldehído se produce rutinariamente en plantas y está presente en niveles de hasta varios cientos de partes por millón en esas diferentes plantas (Adrian-Romero *et al.*, 1999). Entonces, ni el DCSA ni el formaldehído generado por la acción del DMO en dicamba plantea un riesgo significativo a la seguridad en la alimentación humana o animal.

Se evaluó la especificidad de sustrato para la proteína DMO para comprender las posibles interacciones que la proteína DMO pudiera tener con sustratos potenciales presentes en el algodón MON 88701. La literatura indica que la especificidad de la DMO para dicamba se debe a las interacciones específicas que ocurren en el sitio catalítico (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009). El dicamba interacciona con aminoácidos en el sitio catalítico de la DMO a través de la parte carboxílica y los átomos de cloro de dicamba, que están involucrados principalmente en la orientación del sustrato en el sitio catalítico. Estos átomos de cloro son necesarios para la catálisis (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009). Dada la limitada existencia de compuestos clorados con estructuras similares a dicamba en plantas y otros eucariotas (Wishart, 2010; Wishart *et al.*, 2009), es poco probable que la DMO catalice la conversión de otros sustratos endógenos.

PAT.

El modo de acción de la proteína PAT se ha evaluado extensivamente y se ha clasificado como una acetiltransferasa que acetila el glufosinato para producir N-acetil glufosinato sin capacidad herbicida. El glufosinato es una mezcla racémica de formas D y L de fosfotricina, aunque sólo la forma L tiene actividad herbicida. La actividad herbicida del glufosinato resulta de la unión de L-fosfotricina a la glutamina sintetasa (OECD, 1999; 2002).

La glutamina sintetasa es responsable de la asimilación del amoníaco durante la fotorrespiración. La unión de la L-fosfotricina a la glutamina sintetasa resulta en la inactivación de la enzima y una acumulación tóxica de amoníaco dentro de la planta que desencadena la muerte de la planta (Manderscheid y Wild, 1986; OECD, 1999; 2002; Wild y Manderscheid, 1984).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Las proteínas PAT, incluyendo la PAT (*bar*), son altamente específicas para glufosinato en presencia de acetil-CoA (Thompson *et al.*, 1987; Wehrmann *et al.*, 1996). Mientras que la actividad herbicida del glufosinato viene de la forma L-aminoácido, otros L-aminoácidos no pueden ser acetilados por la proteína PAT, y los ensayos de competencia conteniendo glufosinato, concentraciones altas de otros aminoácidos y la proteína PAT no mostraron inhibición de la acetilación del glufosinato (Wehrmann *et al.*, 1996). Más aún, el L-glutamato, un análogo del glufosinato, tampoco mostró inhibición de la acetilación de glufosinato en ensayos de competencia (Wehrmann *et al.*, 1996). Además, la proteína PAT tiene una afinidad más de 30 veces mayor hacia la L-fosfinotricina que sobre otros análogos en plantas (Thompson *et al.*, 1987). Así, la proteína PAT tiene gran especificidad de sustrato por la L-fosfinotricina, el componente herbicida del glufosinato, y es poco probable que afecte el sistema metabólico del algodón MON 88701. Se han evaluado muchos productos con tolerancia al glufosinato incluyendo aquellos en algodón, maíz, soya, canola, remolacha y arroz sin identificar puntos que causen preocupación (ILSI-CERA, 2011) (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

I.p. Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras (promotores, terminadores y otras), descripción, número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard[®]III [que es un evento apilado por cruce mendeliana que se compone de los eventos Bollgard[®]II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex[®] (MON 88913) y DGT[®] (MON 88701).

Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de todas las secuencias heredadas de los eventos individuales comprendidos en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, incluyendo promotores, terminadores y otras secuencias auxiliares, se muestran en las Tablas 1–6. Las representaciones esquemáticas de los vectores utilizados para transferir los insertos en los eventos individuales se presentan en las Figuras 1-5 y 8, y las representaciones esquemáticas lineales se presentan en las Figuras 9-14 (**ANEXO 11. MSL0029106 Análisis de Secuencia de eventos individuales en evento apilado**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

DESCRIPCIÓN.

Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).

Monsanto desarrolló el algodón MON 88702, que produce una proteína insecticida mCry51Aa2 (gen *mCry51Aa2*), derivada de la bacteria *B. thuringiensis*, que lo protege contra el daño de insectos hemípteros y tisanópteros plaga objetivo. El algodón MON 88702 se produjo mediante transformación de tejido de algodón mediada por *Agrobacterium*, utilizando el vector de transformación PV-GHIR508523 (Figura 1) de aproximadamente 14.6 kb (Tabla 1). Este plásmido contiene dos ADN de transformación (ADN-T) independientes, cada uno delineado por regiones borde derechas e izquierdas (**ANEXO 4. MSL0027648 Caracterización Molecular MON 88702**).

Evento Bollgard[®]III (Desarrollado por Monsanto bajo contrato de licenciamiento del evento COT102) y los eventos comprendidos en el (COT102 x Bollgard[®]II).

Monsanto desarrolló el algodón Bollgard[®]III, evento apilado que presenta protección contra el ataque de insectos lepidópteros plaga objetivo, mediante cruce mendeliana convencional entre el evento Bollgard[®]II (MON 15985) de Monsanto y el evento COT102 de Syngenta. Esto se realizó bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína insecticida Vip3A, aislada de *B. thuringiensis* cepa AB88. De igual manera, el evento MON 15985 se produjo a través de la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* en el genoma del algodón Bollgard[®] (MON 531), variedad DP 50 B. El algodón MON 531 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Ambos eventos (COT102 y MON 15985) proveen protección contra daños por ataque de varias especies de insectos lepidópteros plaga del algodón (**ANEXO 6. MSL0024592 Southern blot confirma COT102 y MON 15985 en Bollgard 3**).

Evento COT102 (Propiedad de Syngenta y licenciado a Monsanto).

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1, utilizando los siguientes cassettes de expresión dentro de los bordes izquierdo y derecho de la región del ADN-T (la región designada para ser transferida e integrada al genoma de la planta de algodón) (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica Evento COT102 FDA 2005**):

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

1. Secuencia codificante del gen *aph4*, derivado de *E. coli*, que codifica el marcador selectivo enzima APH4; la expresión *in planta* del gen *aph4* es regulada corriente arriba por el promotor más el primer Intrón del gen *ubiquitina-3* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS 3 (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*).
2. Secuencia codificante del gen *vip3Aa19*, un gen sintético diseñado para alojar el sesgo de codones de maíz y codificando una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la proteína nativa Vip3A de *B. thuringiensis*, con la excepción de una sola sustitución de una lisina por una glutamina en la posición 284. La expresión *in planta* del gen *vip3Aa19* se regula corriente arriba por la región promotora (promotor más elementos asociados haciendo un total de 1,407 pb) del gen *actina-2* de *A. thaliana* y corriente abajo por el terminador NOS (extremo 3' no traducido del gen de la nopalina sintasa). Syngenta declara que el promotor confiere expresión constitutiva del gen *vip3Aa19*.

Para información más detallada consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

Evento Bollgard®II (MON 15985) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 15985 fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531), que contiene los genes *cry1Ac* y *nptII*, mediante bombardeo de partículas o biobalística. El plásmido utilizado para la transformación fue PV-GHBK11 (Figura 4), que contiene los cassettes de los genes *cry2Ab* y *uidA*. El plásmido se propagó en *E. coli* y se purificó de suspensiones bacterianas usando una columna de purificación. El evento MON 15985 le provee al algodón resistencia al ataque de larvas de cinco especies de lepidópteros: gusano tabacalero (*H. virescens*), gusano bellotero (*H. zea*), gusano cogollero (*S. frugiperda*), gusano soldado (*S. exigua*) y gusano rosado (*P. gossypiella*) (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

El algodón MON 88913 se desarrolló vía transformación con *A. tumefaciens* de la variedad de algodón Coker 312, para insertar un constructo con doble copia del gen *cp4 epsps* que codifica la enzima CP4 EPSPS. Esta proteína le confiere la característica de tolerancia a los herbicidas no selectivos de la familia Faena® (ingrediente activo glifosato). En este evento, que contiene

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

un inserto único, las características de la inserción y de las secuencias flanqueantes están conservadas. Aparte de tolerancia al herbicida, conferida por la inserción del evento MON 88913, no hay diferencias biológicamente significativas entre el algodón MON 88913 y su contraparte convencional (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

Monsanto desarrolló el algodón MON 88701 tolerante a los herbicidas dicamba y glufosinato que permite aplicaciones de dicamba sobre el cultivo para controlar malezas de hoja ancha desde la preemergencia hasta siete días previos a la cosecha y de glufosinato para un amplio espectro de control de malezas desde la emergencia hasta la floración temprana. El evento MON 88701 provee una ventana de aplicación de dicamba más amplia más allá de los usos actuales de presembrado, y la aplicación de glufosinato a dosis y tiempos equivalentes a los utilizados en el algodón tolerante a glufosinato comercial actual. La combinación de estos dos modos de acción herbicida únicos provee un sistema de manejo de malezas efectivo para la producción de algodón. El herbicida dicamba provee control efectivo sobre más de 95 especies de maleza anual y bianual y supresión de más de 100 especies de malezas perennes y leñosas. El glufosinato, que es un herbicida de contacto de amplio espectro, provee control no selectivo de aproximadamente 120 malezas de hoja ancha y zacates (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS.**Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).**

El número de copias insertadas se determinó identificando el número de secuencias de unión del inserto y el ADN genómico del algodón. Se identificaron dos sitios de unión en MON 88702 conteniendo la secuencia de unión entre el ADN-T I y el ADN genómico flanqueante de la planta, confirmando que hay una sola copia del inserto en MON 88702.

Los resultados de la caracterización molecular demuestran que MON 88702 contiene una sola copia del inserto ADN-T I (conteniendo la secuencia codificante de la proteína mCry51Aa2), que el inserto no contiene secuencias del esqueleto del plásmido y se encuentra integrado de manera estable en un locus individual y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos a través de múltiples generaciones (**ANEXO 5. Solicitud MON 88702 FDA**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Bollgard®III (Desarrollado por Monsanto bajo contrato de licenciamiento del evento COT102) y los eventos comprendidos en él (COT102 x Bollgard®II).

El algodón COT102, fue desarrollado por Syngenta, mediante la construcción del plásmido vector binario de *A. tumefaciens*, pCOT-1. Syngenta resumió los resultados del análisis de hibridación Southern Blot del ADN genómico usado para evaluar el evento insertado. Basados en esos análisis, **Syngenta declara que el evento COT102 contiene un inserto con una copia sencilla de los cassettes de expresión de los genes Vip3A(a) y aph4**, sin encontrarse transferencia de secuencias fuera del ADN-T (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica Evento COT102 FDA 2005**).

El algodón MON 15985 fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* en el genoma del algodón Bollgard® (MON 531) variedad DP50B, que contiene los genes *cry1Ac* y *nptII*, mediante bombardeo de partículas o biobalística. El plásmido utilizado para la transformación fue el PV-GHBK11 (Figura 4), que contiene los cassettes de los genes *cry2Ab* y *uidA*. El plásmido se propagó en *E. coli* y se purificó de suspensiones bacterianas usando una columna de purificación. En las Tablas 3 y 4 se muestran resúmenes de los componentes genéticos de los plásmidos PV-GHBK04 y PV-GHBK11, utilizados para obtener el algodón MON 531 y MON 15985, respectivamente.

El ADN insertado en el algodón MON 15985 se caracterizó por medio de técnicas moleculares tradicionales. Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de inserciones (número de *loci* de integración en el genoma del algodón), el número de copias (número de transgenes en un *locus* individual), la integridad de las regiones codificantes *cry2Ab* y *uidA*, la integridad de los cassettes de expresión de *cry2Ab* y *uidA*, y para confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Se utilizaron las secuencias del plásmido PV-GHBK11, el esqueleto del plásmido, las regiones codificantes *cry2Ab* y *uidA*, el promotor potenciado 35S CaMV y la secuencia de poliadenilación NOS 3'. Adicionalmente, se verificaron las regiones de unión 5' y 3' entre el inserto y el ADN de la planta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los datos muestran que el algodón MON 15985 contiene una inserción de ADN del fragmento lineal del plásmido PV-GHBK11. El inserto contiene una copia de cada cassette de expresión, cry2Ab y uidA. Este evento no contiene secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHBK11. Por lo tanto, se concluye que en el evento MON 15985, se deben producir proteínas Cry2Ab y GUS de tamaño normal, como resultado de la integración del segmento de ADN derivado del plásmido PV-GHBK11 (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

La caracterización del algodón Bollgard® (MON 531), contenido en el evento Bollgard®II (MON 15985), demostró que en MON 531 hay dos insertos de ADN-T. El inserto funcional primario contiene una única copia del gen completo de *cry1Ac*, el gen *nptII* y el gen de resistencia a antibióticos *aad*. Este inserto de ADN-T también contiene una porción de 892 pares de bases del extremo 3' del gen *cry1Ac* fusionado a la secuencia de terminación transcripcional 7S 3'. Este segmento de ADN se encuentra en el extremo 5' del inserto, en forma contigua y en orientación inversa al cassette del gen completo *cry1Ac* y no contiene un promotor. Se detectó un transcrito por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), que corresponde a este segmento 3' del gen *cry1Ac* y al ADN genómico adyacente. En la improbable eventualidad de que este ARN fuera traducido, el péptido resultante sería altamente homólogo a la porción correspondiente al dominio C-terminal de la proteína Cry1Ac. La seguridad de esta proteína teórica se demuestra con los estudios descritos en las secciones siguientes, ya que la proteína, de ser producida, habría sido un componente en todos los estudios de seguridad llevados a cabo tanto con la proteína Cry1Ac, como con plantas o semillas de algodón Bollgard® (Serdy *et al.*, 1994).

El segundo inserto de ADN-T contiene una porción de 242 pares de bases de la secuencia de poliadenilación 7S 3' de la región terminal del gen *cry1Ac*. No se detectó transcrito de ARN por RT-PCR, que correspondiera o hubiera sido transcrito del inserto de ADN-T de 242 pares de bases 7S 3', por lo tanto, no se produce ningún péptido, según lo esperado (**ANEXO 12. MSL16882 Caracterización Molecular Extendida Bollgard® MON-531**).

El algodón MON 15985 resistente al ataque de insectos plaga del orden *Lepidoptera* fue desarrollado por el método de biobalística, empleando el fragmento KpnI del plásmido PV-GHBK11 que contiene los cassettes de expresión de *cry2Ab* y *uidA*. El evento MON 15985 no contiene secuencias detectables del esqueleto del plásmido como producto de la transformación.

La caracterización molecular del evento MON 15985 fue descrita por Doherty *et al.* (2000). **Esta caracterización, basada en análisis de hibridación Southern blot, demostró que en MON 15985, adicional a los insertos de ADN presentes en su línea parental (Bollgard, MON 531), se había integrado una copia de ADN del fragmento de restricción utilizado para la transformación.** En este estudio, en el cual se realizaron análisis de PCR seguidos de secuenciación al inserto en MON 15985, se confirmaron los hallazgos previos demostrando el orden esperado de los elementos contenidos en el inserto del evento MON 15985. Además, se obtuvo la secuencia de ADN del inserto completo en el evento mencionado, la cual fue idéntica a lo previamente reportado (**ANEXO 13. MSL17099 Confirmación secuencias flanqueantes MON 15985**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

El evento MON 88913 fue generado mediante la integración estable de dos “cassettes” de expresión del gen *cp4 epsps* en el genoma del algodón, utilizando el sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens*. Los datos muestran que MON 88913 contiene una copia del ADN insertado en un *locus* simple de integración dentro del fragmento de restricción *SpeI* de ~13.0 kb que contiene dos “cassettes” de expresión del gen *cp4 epsps* intactos. No se detectaron elementos adicionales del vector binario de transformación PV-GHGT35 (Figura 5) en el genoma del algodón MON 88913. La segregación mendeliana del fenotipo esperado en MON 88913 a través de múltiples generaciones, corrobora el análisis molecular de la estabilidad del inserto y establece el comportamiento genético del ADN insertado en un *locus* simple (**ANEXO 14. MSL19580 Análisis molecular de MON 88913**).

Se realizaron análisis moleculares para caracterizar el ADN integrado en el evento MON 88913. Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de insertos de ADN (número de sitios de integración dentro del genoma del algodón), número de copias (el número de copias en un mismo inserto), la integridad de los cassettes del gen *cp4 epsps*, y para establecer la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido en el genoma de la planta.

Los datos muestran que el evento MON 88913 contiene una copia del inserto de ADN en un locus de integración individual en un fragmento de restricción *SpeI* que contiene dos cassettes de expresión intactos del gen *cp4 epsps*. No se detectaron elementos adicionales del vector de transformación PV-GHGT35 (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

Se caracterizó el inserto de ADN en el evento MON 88701 por medio de un análisis de hibridación Southern blot, PCR y análisis de secuencia de ADN. **Los resultados de esta caracterización demuestran que MON 88701 contiene una copia de los cassettes de expresión de los genes *dmo* y *bar*, no contiene secuencias del esqueleto del plásmido, el ADN-T se encuentra integrado de manera estable en un locus individual y se hereda de acuerdo a los principios mendelianos a través de múltiples generaciones.** Los elementos genéticos presentes en el algodón MON 88701 se muestran en la Tabla 6. Estas conclusiones se basaron en varias evidencias:

1) Se analizó por Southern Blot todo el genoma del algodón para identificar la presencia del ADN-T y la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997, y se demostró que se insertó solo una copia del ADN-T en un solo sitio de inserción y que el inserto se hereda establemente;

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

2) Se realizaron análisis de secuencia para determinar la secuencia exacta del ADN insertado y las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto, permitiendo la comparación de la secuencia del ADN-T en el plásmido vector para confirmar que sólo las secuencias esperadas se integraron;

3) Se compararon las secuencias de ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional para identificar cualquier rearrreglo que pudiera ocurrir en el sitio de inserción durante la transformación. En conjunto, la caracterización de la modificación genética demuestra que una sola copia del ADN-T se integró establemente en un solo *locus* del genoma del algodón y que no hay secuencias del esqueleto del plásmido presentes en el algodón MON 88701.

Se utilizó el análisis de hibridación Southern blot para determinar el número de copias y de sitios de inserción del ADN integrado, así como la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. La estrategia del Southern blot fue diseñada para asegurar que todos los segmentos transgénicos potenciales se identificaran. Todo el genoma del algodón fue analizado utilizando sondas que abarcaban todo el plásmido vector para detectar la presencia del inserto, así como confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. Esto se logró usando sondas de no más de 2.5 Kb de largo para asegurar un alto nivel de sensibilidad del ensayo. Esto se demostró mediante la detección de un control positivo añadido a 0.1 copias de genomas equivalentes. Se escogieron específicamente dos sets de enzimas de restricción para caracterizar por completo el ADN-T y detectar cualquier fragmento potencial de ADN-T y secuencias del esqueleto del plásmido. Las enzimas de restricción fueron escogidas de manera que cada enzima corta una vez dentro del ADN-T insertado, y por lo menos una vez dentro del ADN flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto. Como consecuencia, por lo menos un segmento conteniendo una porción del inserto con el ADN 5' flanqueante adyacente generado por un set de las enzimas es de tamaño predecible y se sobrepone con otro segmento de tamaño predecible conteniendo una porción del inserto con el ADN 3' flanqueante adyacente generado por otro set de enzimas. Este diseño de dos sets de enzimas asegura que el inserto completo se identifique en un patrón de hibridación predecible. Esta estrategia también maximiza la posibilidad de detectar una inserción en otro lugar del genoma que podría ser pasado por alto si esa banda co-migrara en el gel con una banda esperada.

Para determinar el número de copias y sitios de inserción del ADN-T, y la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido, se corrieron muestras por duplicado con la misma cantidad de ADN digerido en un gel de agarosa. Un set de muestras se corrió por un periodo de tiempo mayor (corrida larga) que el segundo set (corrida corta). La corrida larga permite mayor resolución de ADN de alto peso molecular, mientras que la corrida corta permite retener el ADN de bajo peso molecular en el gel. Estos análisis determinaron que se insertó una sola copia del

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

ADN-T en un solo *locus* de integración en el genoma del algodón y que no se detectaron elementos adicionales incluyendo secuencias del esqueleto del plásmido PV-GHHT6997 en el algodón MON 88701.

Los análisis de PCR y de secuencia de ADN complementan los análisis de hibridación Southern blot. Se realizaron estos análisis adicionales para determinar la secuencia completa de ADN del inserto y secuencias de ADN flanqueantes en el algodón MON 88701, confirmaron la organización predicha de los elementos genéticos dentro del inserto, y determinaron las secuencias flanqueando el inserto. Adicionalmente, los análisis de secuencia confirmaron que cada elemento genético (excepto por las regiones borde) en el inserto está intacta y que la secuencia del inserto es idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido PV-GHHT6997 (Figuras 6 y 7). Más aún, la organización genómica del inserto MON 88071 se determinó comparando la secuencia flanqueando los extremos 5' y 3' del inserto con la secuencia del sitio de inserción en el algodón convencional. Los análisis de hibridación Southern blot confirmaron que el ADN-T reportado representa el único inserto detectable en el evento MON 88701 (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

PERTENENCIA DE ESTAS SECUENCIAS A LA ESPECIE RECEPTORA E INCLUSIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS HOMÓLOGAS A LA ESPECIE RECEPTORA.

En la sección I.I. **Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de efectos no esperados**, subsección **EXPRESIÓN DE LAS SECUENCIAS IRRELEVANTES PARA LA EXPRESIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA** (Ver Págs. 97-100), se discuten las secuencias reguladoras, incluyendo promotores, terminadores y secuencias auxiliares, y las especies de las cuales provienen. Las secuencias reguladoras incluidas en los diferentes eventos individuales que conforman el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 provienen de especies diferentes al algodón y han sido utilizadas de manera común en diversas transformaciones para diversos eventos biotecnológicos en diferentes cultivos como algodón, soya y maíz, entre otros.

I.q. Patogenicidad o virulencia de los organismos receptores y donadores.

***Bacillus thuringiensis* (Proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac y Cry2Ab y Vip3A).**

La bacteria *B. thuringiensis* es un microorganismo del suelo, Gram positivo, que forma esporas y se puede encontrar en ambientes de todo el mundo, incluso en México (Kaji *et al.*, 1994). Además de la producción de esporas, estas bacterias también se caracterizan por la

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

producción de cristales de proteína durante el proceso de esporulación. La propiedad insecticida de *B. thuringiensis* es conferida por las proteínas presentes en los cristales (proteínas Cry). Las proteínas insecticidas producidas por *Bt* se han estudiado durante años en cuanto a su especificidad, toxicidad y modo de acción (Nester *et al.*, 2002). La exposición de los organismos vivos y el medio ambiente a las proteínas producidas por *Bt* es un evento que se produce en abundancia en la naturaleza.

Analizando la identidad en la secuencia de aminoácidos para proteínas insecticidas se puede predecir la similitud en su función biológica, por ejemplo, actividad contra un espectro similar de insectos. Se ha establecido que las proteínas Cry tienen un espectro insecticida definido dentro de un Orden (Crickmore *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001). Este alto grado de especificidad se basa en cuatro niveles de selectividad, que llevan conjuntamente a la intoxicación (Federici, 2002).

El modo de acción de las proteínas de *Bt* requiere, en general, la ingestión por el insecto, activación proteolítica (que convierte la forma de protoxina inactiva de la proteína *Bt* a la forma toxina activa), unión a receptores en el intestino medio del insecto, oligomerización en la interfase de la membrana, y formación de poros en la membrana de las células del intestino, que a su vez, conduce a la muerte del insecto (Gill *et al.*, 1992; OECD, 2007; Pigott y Ellar, 2007; Schnepf *et al.*, 1998; Vachon *et al.*, 2012). Cada uno de estos pasos puede definir la especificidad de las proteínas *Bt*, dado que la inhabilidad de una proteína de comportarse correctamente en cualquiera de los pasos la dejará inactiva al insecto.

En consecuencia, sólo aquellos insectos con receptores específicos se ven afectados, y no se observa toxicidad en especies que carecen de estos receptores. Por ejemplo, las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F son activas contra insectos lepidópteros, pero no contra coleópteros, y la proteína Cry3Bb1 es activa contra insectos coleópteros (larvas) que atacan las raíces del maíz, pero no contra lepidópteros.

Las proteínas Cry han sido utilizadas comercialmente desde 1958 como productos microbiológicos con actividad insecticida (EPA, 1988), y en cultivos biotecnológicos, durante muchos años. La muy baja toxicidad de los productos insecticidas derivados de *Bt* en mamíferos ha sido demostrada en muchos estudios de seguridad, y no existen casos confirmados de reacciones alérgicas a las proteínas Cry en aplicaciones de productos microbianos derivados de *Bt*, durante los más de 50 años de uso. Hay por lo menos 180 productos microbianos comerciales basados en *Bt* en Estados Unidos, Canadá, México y varios países de América del Sur, así como en prácticamente todos los países de la Unión Europea, China, Australia y países de Europa del Este (EPA, 1998; Baum *et al.*, 1999). Los cultivos en los cuales se utilizan estas formulaciones tradicionalmente incluyen diversas hortalizas, árboles frutales, las alcachofas, cerezas y granos almacenados, tales como el trigo.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

***Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 (Proteína CP4 EPSPS).**

La bacteria *A. tumefaciens* cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizósfera de las plantas. Únicamente el gen *cp4 epsps* de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes al herbicida glifosato. La secuencia del ADN transferido y de la proteína producida es completamente conocida y se encuentra presente en todas las plantas y en la mayoría de los microorganismos que comúnmente son parte de nuestra dieta, y no existe evidencia de que esta proteína pueda causar algún efecto negativo en la salud humana o de cualquier otro vertebrado. Adicionalmente, no se espera que los humanos estén expuestos a la proteína CP4 EPSPS expresada por algodones biotecnológicos, ya que el aceite derivado del algodón utilizado para el consumo humano no contiene esta proteína (Fuchs, 1994).

La proteína CP4 EPSPS no presenta homología con las secuencias de aminoácidos de proteínas tóxicas y alergénicas de las bases de datos Pir Protein, Swissprot (Bairoch y Boeckmann, 1993) y Genpept (Benson *et al.*, 1993). La secuencia de aminoácidos o regiones de alta homología entre dos o más proteínas puede proveer información importante sobre la actividad biológica de una proteína. Es decir, la secuencia de aminoácidos puede proveer información acerca de las propiedades estructurales, hidrofóbicas e hidrofílicas, inmunogenicidad, estabilidad y la posible función de la proteína identificada.

El uso de bases de datos ha demostrado ser una excelente herramienta para predecir la función biológica de proteínas desconocidas. La secuencia de la proteína CP4 EPSPS fue comparada con las secuencias peptídicas identificadas como “alérgenos” y “toxinas” de todas las bases de proteínas disponibles para identificar si la proteína CP4 EPSPS tiene alguna homología con alérgenos o toxinas. Los resultados muestran que ***no existe ninguna homología significativa entre las secuencias de los alérgenos y toxinas conocidas y la secuencia de la proteína CP4 EPSPS***. La conclusión de que esta proteína no es tóxica está apoyada en los resultados de estudios de toxicología aguda en ratones, donde no se encontró ninguna evidencia de efectos tóxicos en los animales de prueba cuando se administró una dosis de 572 mg/kg de la proteína CP4 EPSPS (Naylor, 1993).

La introducción de variedades de algodón tolerantes al herbicida glifosato no presenta ningún riesgo de provocar reacciones alérgicas. El aceite de la semilla de algodón es el producto más utilizado para el consumo humano y los análisis del aceite derivado de variedades de MON 15985 × MON 88913 (que comparte esta proteína con el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913) confirmaron que no existe proteína CP4 EPSPS detectable en el aceite para uso industrial (Fuchs, 1994). Con base en estos resultados no se espera un consumo humano significativo de esta proteína. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS no muestra homología con ninguna de las secuencias de alérgenos en las tres bases de datos de proteínas actuales (Mitsky, 1993; Genpet, Pir

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

protein y Swissprot) y, por lo tanto, se concluye que la proteína CP4 EPSPS no presenta ningún potencial alergénico para los humanos. Adicionalmente, la proteína CP4 EPSPS es rápidamente desnaturalizada por el calor y la digestión enzimática y ácida en fluidos gástricos simulados (ANZFA, 2001).

La proteína CP4 EPSPS purificada en dosis agudas de 572 mg/kg de peso corporal no produjo efectos adversos en ratones. Esta dosis representa más de 1000 veces el consumo potencial previsto de CP4 EPSPS en alimentos derivados de todos los cultivos GM expresando esta enzima bajo desarrollo por Monsanto en ese tiempo (soya, papa, tomate, maíz) (Harrison *et al.*, 1996).

***Stenotrophomonas maltophilia* (Proteína DMO)**

El gen *dmo* se deriva de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* cepa DI-6, aislada del suelo en una planta de manufactura de dicamba (Krueger *et al.*, 1989). *S. maltophilia* se llamaba originalmente *Pseudomonas maltophilia*, y transferida al género *Xanthomonas* antes de recibir su propio género (Palleroni y Bradbury, 1993). La taxonomía de *S. maltophilia* es (Palleroni y Bradbury, 1993; Ryan *et al.*, 2009):

Reino: Bacteria
Rama: Proteobacteria
Clase: Gammaproteobacteria
Orden: Xanthomonadales
Familia: Xanthomonadaceae
Género: *Stenotrophomonas*

S. maltophilia es una bacteria aeróbica (Gram negativa) ubicada comúnmente presente en ambientes acuáticos, el suelo y plantas. Esta especie está ubicuamente relacionada con plantas y se ha aislado de la rizósfera de trigo, maíz, zacates, betabel, pepino, papa, fresa, caña de azúcar y canola (Berg *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 1999; Berg *et al.*, 2002; Denton *et al.*, 1998; Echemendia, 2010; Juhnke y des Jardin, 1989; Juhnke *et al.*, 1987; Lambert *et al.*, 1987). Esta bacteria también se ha aislado de semilla de algodón, ejotes y café (Nunes y de Melo, 2006; Swings *et al.*, 1983); así, *S. maltophilia* se puede encontrar en una variedad de alimentos y piensos. También está ampliamente distribuida en el hogar y puede encontrarse alrededor de esponjas, plantas, frutas, vegetales, pescado congelado, leche y aves (Berg *et al.*, 1999; Denton y Kerr, 1998; Echemendia, 2010). Se han encontrado cepas de *S. maltophilia* en la flora temporal de pacientes hospitalizados como un organismo comensal (Echemendia, 2010). También se puede encontrar en individuos sanos sin causar daño a la salud humana (Denton *et al.*, 1998) y las infecciones causadas por *S. maltophilia* en humanos son extremadamente

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

poco comunes (Cunha, 2010). De manera similar a las bacterias nativas del tracto gastrointestinal, *S. maltophilia* puede ser un patógeno oportunista (Berg, 1996). Como tal, esta bacteria es de virulencia baja en pacientes inmuno-comprometidos donde una serie de factores de riesgo (debilidad severa, la presencia de aparatos internos como tubos ventiladores o catéteres, por periodos de tiempo prolongado y tratamientos antibióticos prolongados) deben ocurrir para la colonización por *S. maltophilia* en humanos (Ryan *et al.*, 2009). Por lo tanto, las infecciones por esta bacteria ocurren casi exclusivamente en hospitales, en cuyo caso se encuentran solo presentes en un mínimo porcentaje de las infecciones (Ryan *et al.*, 2009). Finalmente, no se ha reportado *S. maltophilia* como fuente de alérgenos.

La presencia ubicua de *S. maltophilia* en el ambiente, la presencia en individuos sanos sin causar infecciones, la presencia incidental en alimentos sin reportes de efectos adversos y la falta de alergenicidad establece la seguridad de este organismo.

***Streptomyces hygrosopicus* (Proteína PAT)**

El gen *bar* se deriva de la bacteria *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson *et al.*, 1987). La taxonomía de *S. hygrosopicus* es (Waksman y Henrici, 1943):

Reino: Bacteria
Rama: Actinobacteria
Clase: Actinobacteria
Orden: Actinomycetales
Familia: Streptomycetaceae
Género: Streptomyces

S. hygrosopicus es una bacteria saprofítica del suelo sin problemática de seguridad conocida. Las especies del género *Streptomyces* se encuentran distribuidas ampliamente en el ambiente y no presentan alérgenos conocidos o problemas de toxicidad (Kämpfer, 2006; Kutzner, 1981), aunque la exposición humana es bastante común (Goodfellow y Williams, 1983). Esta bacteria no se considera patógena de plantas, humanos y otros animales (Cross, 1989; Goodfellow y Williams, 1983; Locci, 1989). La historia de uso seguro de *S. hygrosopicus* se aborda en Hérouet *et al.* (2005) y este organismo ha sido ampliamente revisado durante la evaluación de varios eventos de tolerancia a glufosinato sin haberse identificado problemas de seguridad o alergenicidad por la FDA y otras agencias regulatorias.

La presencia ubicua de *S. hygrosopicus* en el ambiente, la amplia exposición humana sin reportes de efectos adversos sobre la seguridad o alergenicidad y las revisiones de varios eventos tolerantes a glufosinato por parte de reguladores no habiendo identificado problemáticas de seguridad o alergenicidad, establece aún más la seguridad de este organismo.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Algodón: *Gossypium hirsutum*

En cuanto al algodón *Gossypium hirsutum*, receptor del evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, no presenta ni ha presentado históricamente patogenicidad o virulencia. Además, como variedad altamente domesticada, no presenta potencial de convertirse en maleza (Baker, 1965).

I.r. Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotipo que confiere estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de estos genes.

En los eventos MON 531 y MON 15985 se utilizó el gen *nptII* como marcador de selección (resistencia a kanamicina). Este gen también se encuentra en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. El producto de la expresión de este gen es la proteína NPTII (neomicina fosfotransferasa) que ha sido utilizada, en numerosos estudios con diferentes especies vegetales, como marcador de selección de células vegetales transformadas. Las plantas que contienen el gen *nptII* resisten aplicaciones del antibiótico kanamicina y se inhibe el crecimiento de las que no fueron transformadas. Así, las plantas resistentes tendrán los genes de interés, en este caso los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* (que codifican las proteínas insecticidas específicas para lepidópteros). La proteína NPTII no es útil para ningún otro propósito y carece de propiedades insecticidas. Además, se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y en la cadena alimenticia; los microorganismos resistentes a kanamicina se presentan en forma natural en el suelo y en los sistemas digestivos de mamíferos (Flavell *et al.*, 1992).

Varias autoridades regulatorias en todo el mundo han confirmado la seguridad de las proteínas NPTII para los humanos y otros organismos cuando se ha liberado al ambiente. La Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), por ejemplo, ha exentado a la proteína NPTII, y al material genético necesario para su producción, del requerimiento de un rango de tolerancia cuando es usada como un ingrediente inerte de plantas modificadas para ser insecticidas (EPA, 1994).

El gen *aad* que codifica la enzima 3'' (9)-O-aminoglicósido adenililtransferasa (AAD), fue utilizado en el laboratorio antes de la producción de las plantas genéticamente modificadas, para selección de bacterias que contenían el plásmido con la construcción a utilizar en la transformación del algodón. Esta proteína confiere resistencia a los antibióticos estreptomycin y espectinomycin (Davies y Benveniste, 1974). El gen *aad* no se expresa en plantas debido a

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

que se encuentra bajo el control de su promotor bacteriano, el cual no es activo en plantas y no se han adicionado los elementos genéticos necesarios para su expresión en tejidos vegetales. Este gen no codifica ninguna proteína que le confiera una nueva característica a la planta.

El gen *uidA*, que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS), también se usa como reportero para evaluar la transferencia del material genético nuevo a la planta receptora. La enzima GUS transforma un sustrato incoloro a un producto de color azul en un ensayo sencillo y ha sido ampliamente utilizado en transformaciones de plantas como algodón, maíz y tabaco. Existe un largo historial de uso seguro de la proteína GUS. La actividad bioquímica y catalítica de esta proteína se ha estudiado minuciosamente (Wang y Touster, 1972). La exposición de seres humanos a GUS es frecuente a través de las células epiteliales y la microflora del intestino, exposición bacteriana y muchos alimentos que la contienen sin conocerse efectos dañinos (Glissen *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha detectado actividad enzimática similar a la de GUS en cerca de 50 especies vegetales en diversos tejidos que incluyen embrión, fruto, testa y endospermo (Hu *et al.*, 1990). Las especies vegetales mencionadas incluyen varias que son fuente de alimento para los humanos, como papa, manzana, almendra, centeno, ruibarbo y caña de azúcar (Schulz y Weissenbock, 1987; Hodal *et al.*, 1992; Wozniak y Owens, 1994). GUS también está presente en la carne de res y en especies de invertebrados como los nematodos, moluscos, caracoles e insectos (Glissen *et al.*, 1998). Además, no se conocen efectos dañinos de GUS, incluso aunque sea ingerida en alimentos crudos como mariscos y los metabolitos producto de su actividad no son tóxicos (Glissen *et al.*, 1998).

Se ha demostrado por análisis Western blot y ensayos de actividad enzimática que la proteína GUS se degrada rápidamente en simulaciones de fluidos gástricos e intestinales que simulan la digestión humana. A los 15 segundos de exposición a fluidos gástricos no se detectó la proteína GUS ni por Western blot ni en ensayos de actividad enzimática. Basado en estos resultados, se concluyó que la proteína GUS, al ser ingerida por humanos, se degrada fácilmente en el tracto digestivo (Fuchs y Astwood, 1996). De manera similar, la proteína GUS no tiene efecto insecticida y no existe evidencia de que produzca daños al ambiente. GUS está presente en las semillas de algodón en niveles bajos (0.01% del peso fresco) (Kolwyck *et al.*, 1999; Kolwyck *et al.*, 2000), entonces, virtualmente no habría exposición a esta proteína a partir de algodón GM. Dicho de otro modo, GUS ha sido aprobada para su liberación al ambiente por su inherente falta de peligro.

En la construcción del evento COT102, Syngenta también introdujo el gen *aph4* de *E. coli* en el genoma del algodón variedad Coker 130. Este gen codifica la proteína higromicina B fosfotransferasa (APH4). La proteína APH4 sirve como marcador selectivo en la identificación de células vegetales transformadas con el gen *vip3A(a)* (gen de interés con capacidad insecticida en el evento COT102).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) regula los protectantes incorporados a la planta bajo el Acta Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos y el Acta Federal de Insecticidas y Rodenticidas. Bajo las regulaciones de la EPA, la proteína APH4 se considera un ingrediente inerte (**ANEXO 7. Consulta biotecnológica COT102**).

Para información más detallada sobre genes de selección y las proteínas que éstos codifican en el evento COT102, contenido en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

El algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 también contiene dos copias de la enzima CP4 EPSPS, la cual le confiere resistencia al herbicida no selectivo glifosato. Por lo tanto, no fue necesario utilizar genes de selección adicionales en la construcción, porque la proteína CP4 EPSPS actúa como marcador de selección por sí misma. Esto es, las células resistentes a glifosato fueron exitosamente transformadas y ahora poseen la proteína bacteriana que les confiere la resistencia.

En el evento MON 88701, incluido en el evento apilado MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, no se utilizaron genes marcadores de resistencia a antibióticos. Esto se confirma en la Tabla 6, donde se observan los elementos de la construcción genética utilizados en la obtención del evento MON 88701 y la ausencia de genes marcadores de resistencia, por ejemplo, el gen *aad* (**ANEXO 10. Solicitud MON 88701 FDA**).

I.s. Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgén.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard®III [que es un evento apilado por cruce mendeliano que se compone de los eventos Bollgard®II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex® (MON 88913) y DGT® (MON 88701).

Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).

Para demostrar la estabilidad del ADN-T I presente en el evento MON 88702 a través de generaciones múltiples, se realizó un análisis de secuenciación mediante NGS (Next Generation Sequencing) utilizando ADN obtenido de cinco generaciones de mejoramiento de MON 88702 (Generaciones R3, R4, R5, R6 y R7).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Se usó la generación R4 para la caracterización molecular del evento MOM 88702. Las demás generaciones se evaluaron con NGS y se compararon con la generación R4 que fue caracterizada en su totalidad. El control convencional utilizado para evaluar la estabilidad generacional fue DP 393, una variedad convencional con fondo genético similar. Se utilizó ADN genómico aislado de cada generación de MON 88702 y el control convencional.

Para determinar el número de insertos en las generaciones de MON 88702, las secuencias fueron analizadas utilizando NGS (Kovalic *et al.*, 2012). La Tabla 20 muestra el número de sitios de unión únicos conteniendo secuencia de ADN de PV-GHIR508523 determinadas con este análisis.

Tabla 20. Secuencias de los sitios de unión detectados.

Muestra	Sitios de unión detectados
MON 88702 R3	2
MON 88702 R4	2
MON 88702 R5	2
MON 88702 R6	2
MON 88702 R7	2
DP 393	0

El alineamiento de las secuencias de unión para cada generación de MON 88702 analizada a la secuencia inserto/flanco determinada para la generación R4 de MON 88702, confirma que el par de secuencias de unión se origina de la misma región del genoma de MON 88702 y está ligada por una secuencia conocida y esperada de ADN contiguo. Este único par de secuencias de unión se observa como resultado de la inserción de ADN-T I de PV-GHIR508523 en un solo *locus* en el genoma de MON 88702. La consistencia de los datos a través de todas las generaciones analizadas demuestra que este único *locus* se mantuvo estable a través de generaciones confirmando la estabilidad del inserto. Basados la información de secuencias y análisis bioinformático (NGS), se concluye que MON 88702 contiene un solo inserto de ADN-T I estable (**ANEXO 4. MSL0027648 Caracterización Molecular MON 88702**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento COT102 (Propiedad de Syngenta y Licenciado a Monsanto).

La compañía Syngenta caracterizó la heredabilidad del transgén utilizando pruebas estándar para cruza mendeliana. Se realizaron análisis de Chi-cuadrada a los segregantes para mostrar un patrón de herencia estable como se esperaba para un transgén integrado individual.

Para información más detallada consultar la información de heredabilidad del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

Evento Bollgard®II (MON 15985) (Propiedad de Monsanto).

Para determinar la estabilidad del evento MON 15985 a través de generaciones, se realizaron una serie de pruebas de progenie basadas en un ELISA cuantitativo de la proteína Cry2Ab de cuatro generaciones. La significancia estadística se determinó usando análisis de Chi-cuadrada. Todas las generaciones segregaron como se esperaba con un solo sitio de inserción del evento MON 15985. La progenie R1 del evento MON 15985 produjo el índice de segregación esperado de 3:1 respecto a la detección de la proteína Cry2Ab. El análisis de Chi-cuadrada de los resultados de segregación mostraron que el patrón de segregación fue consistente con un solo sitio de inserción en el ADN genómico del algodón y segrega de acuerdo con la genética mendeliana.

Estos datos confirman que el inserto de ADN en el evento MON 15985 contiene un inserto de ADN en un *locus* individual que segrega de acuerdo con la genética mendeliana y que, por lo tanto, permanece integrado establemente en el genoma de la planta a través de generaciones de autopolinización y de retrocruzas sucesivas (**ANEXO 8. Solicitud MON 15985 USDA**).

También se confirmó la estabilidad del evento MON 15985 por medio de análisis de hibridación Southern del inserto de ADN a través de generaciones múltiples. Se utilizaron muestras de ADN genómico de plantas de las generaciones R1, R2, R3, R4 y dos líneas retrocruzadas de segunda generación. Se utilizó toda la región codificante del gen *cry2Ab* para evaluar la estabilidad del ADN insertado a través del tiempo y generaciones de mejoramiento genético. Los resultados muestran que no hay diferencias en los patrones de hibridación entre el ADN extraído de las cinco generaciones. Esto demuestra que el inserto de ADN es estable en el genoma de la planta a través de cinco generaciones de mejoramiento genético (**ANEXO 16. MSL16749 Análisis Molecular de Bollgard®II**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Solución Faena Flex® (MON 88913) (Propiedad de Monsanto).

Durante el desarrollo del evento MON 88913 se realizaron análisis de datos de segregación fenotípica a través de varias generaciones. Se determinó la tolerancia a glifosato de plantas individuales mediante tiras reactivas para la proteína CP4EPSPS y/o tolerancia al herbicida glifosato. Después de la autopolinización de las plantas MON 88913, se plantaron las semillas de la generación R1 y se esperaba que las plantas resultantes segregaran en un índice 3:1 a favor del fenotipo de tolerancia a glifosato como un solo locus de rasgo dominante. En las plantas R1, el valor calculado de Chi-cuadrada para el fenotipo fue menor que el valor crítico de 3.84 con un nivel de error del 5% y, por lo tanto, el evento MON 88913 demostró el índice de segregación 3:1 esperado.

La generación R2 representa un punto en el proceso de mejoramiento genético donde se puede identificar semilla homocigótica. Se identificaron plantas individuales tolerantes a glifosato de la generación R1, se autopolinizaron para producir semilla de generación R2 y se sometieron a análisis de progenie para identificar lotes de semilla homocigótica. Se espera que las familias individuales R2 segreguen en una razón 1:2 para homocigosis después de eliminar a los individuos susceptibles a glifosato de la población. Se generaron 76 familias R2 y se probaron para homocigosis. El valor calculado de Chi-cuadrada fue menor que el valor crítico de 3.84 con un nivel de error de 5%. Por lo tanto, se recobró el número esperado de familias homocigóticas durante el proceso de mejoramiento genético. La selección de lotes de semilla de plantas homocigóticas fue exitosa en la generación R3 y se confirmó en las generaciones R4 y R5. Se espera que los lotes de semillas homocigóticas con el evento MON 88913 segreguen en una razón 1:0 para la característica de tolerancia a glifosato. Los resultados confirmaron la homocigosis y la estabilidad generacional del evento MON 88913 y, por lo tanto, la estabilidad del inserto de ADN (**ANEXO 9. Solicitud MON 88913 USDA**).

Se realizó un análisis de hibridación Southern a lo largo de cinco generaciones de algodón MON 88913. Durante los ensayos se comprobó que este evento contiene una sola copia del inserto en un solo locus de integración, el cual a su vez contiene dos copias intactas del gen *cp4 epsps* y no se encontraron secuencias adicionales del plásmido usado en la transformación. Además, se realizaron análisis de PCR y secuenciación para identificar los sitios de inserción y las regiones flanqueantes 5' y 3' del genoma del algodón, adyacentes a la construcción. Esto confirma la organización correcta de los elementos de la construcción y la estabilidad del evento en múltiples generaciones (**ANEXO 14. MSL19580, Análisis Molecular de MON 88913**).

Los análisis de segregación demostraron patrones de herencia Mendeliana de la característica de tolerancia a glifosato después de autopolinización o retrocruzamiento del evento MON 88913 con otras variedades de algodón. La tolerancia al glifosato y la resistencia a insectos se han mantenido durante el desarrollo de estos eventos desde sus inicios a la fecha, al igual que

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

la calidad de la semilla, que se ha mantenido después de la transferencia de los eventos dentro de distintas variedades comerciales. De acuerdo con estos resultados, **no existe evidencia de inestabilidad genética del evento de algodón MON 88913.**

Evento DGT® (MON 88701) (Propiedad de Monsanto).

El inserto de ADN-T del evento MON 88701 reside en un *locus* individual dentro del genoma del algodón y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos de la herencia. Durante el desarrollo de este evento, se registraron datos de segregación fenotípica y genotípica para evaluar la herencia y estabilidad del evento MON 88701 utilizando el análisis de Chi-cuadrada a través de varias generaciones. El análisis de Chi-cuadrada se basa en comparaciones entre el índice de segregación observado y el índice de segregación esperado de acuerdo con los principios mendelianos.

Las plantas transformadas R0 (generación R0) se autopolinizaron para generar semilla de generación R1. Estas se analizaron utilizando análisis de PCR en tiempo real para la región codificante del gen *dmo*. Se seleccionó una sola planta homocigótica R1 y se autopolinizó para generar plantas de generación R2 que se autopolinizaron para generar semillas de generación R3. Los ensayos fenotípicos y genotípicos confirmaron la ausencia de segregación del inserto en estas generaciones autopolinizadas.

Las plantas homocigótico-positivas R3 se cruzaron con un algodón propiedad de Monsanto que no contenía las secuencias codificantes de los genes *dmo* o *bar* por medio de técnicas de mejoramiento tradicionales para producir semilla heterocigótica F₁. Las plantas F₁, heterocigóticas para la característica de tolerancia a dicamba y glufosinato, se cruzaron con un algodón propiedad de Monsanto que no contenía las secuencias codificantes de los genes *dmo* o *bar* por medio de técnicas de mejoramiento tradicionales para producir semilla BC₁F₁. La generación BC₁F₁ se analizó utilizando aplicación del herbicida glufosinato para seleccionar plantas que contenían el evento MON 88701. Se confirmó que las plantas que sobrevivieron a la aplicación del herbicida eran heterocigóticas para el ADN-T del evento MON 88701 utilizando amplificación por PCR evento- específica con sondas TaqMan. Se autopolinizaron las plantas BC₁F₁ para producir las plantas BC₁F₂. La generación BC₁F₂ fue analizada utilizando aplicación del herbicida glufosinato y las plantas sobrevivientes se analizaron utilizando amplificación por PCR evento- específica con sondas TaqMan para el ADN-T del evento MON 88701.

Se analizó la herencia del ADN-T en las generaciones R1, BC₁F₁ y BC₁F₂. Se predijo una razón de herencia de 1:1 (heterocigoto: homocigoto negativo) del ADN-T del evento MON 88701 para la generación BC₁F₁ de acuerdo con los principios de herencia mendeliana. Se predijo que las generaciones R1 y BC₁F₂ segregarían en una razón 1:2:1 (homocigoto positivo: heterocigoto: homocigoto negativo) de acuerdo con los principios de herencia mendeliana.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Se utilizó un análisis de Chi-cuadrada para comparar los índices de segregación observados del ADN-T del evento MON 88701 con los índices esperados. El valor de Chi-cuadrada en la generación BC₁F₁ indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el índice de segregación observado y el esperado (1:1) (heterocigoto: homocigoto negativo) del ADN-T del evento MON 88701. El valor de Chi-cuadrada para las generaciones R1 y BC₁F₂ indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el índice de segregación observado y el esperado (1:2:1) (homocigoto positivo: heterocigoto: homocigoto negativo) del ADN-T del evento MON 88701. Estos resultados apoyan la conclusión de que el ADN-T del evento MON 88701 reside en un *locus* individual en el genoma del algodón y se hereda de acuerdo con los principios mendelianos de herencia. Estos resultados también son consistentes con los datos de caracterización molecular que indican que el evento MON 88701 contiene una copia intacta de los cassettes de expresión de los genes *dmo* y *bar* insertados en un *locus* individual en el genoma del algodón.

Conclusión.

Tomando en cuenta la estabilidad de los elementos genéticos por varias generaciones, la segregación mendeliana también por varias generaciones, el bajísimo potencial de recombinación entre los insertos en el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, y la viabilidad e idoneidad seriamente comprometidas de las células afectadas por el evento hipotético de translocación genómica, el riesgo de tal recombinación es descartable. Se concluye que los insertos de ADN en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se integraron de manera estable y las características conferidas son fenotípica y genéticamente estables a través de varias generaciones y condiciones ambientales.

I.t. Referencia bibliográfica sobre los datos presentados

Adang, M.J., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F. and Thompson, D.V. 1985. "Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*", *Gene* 36:289-300.

Adrian-Romero, M., G. Blunden, B.G. Carpenter and E. Tyihák. 1999. HPLC quantification of formaldehyde, as formaldemethone, in plants and plant-like organisms. *Chromatographia* 50:160-166.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Advancing Cotton Education. 2017. Integrated crop management. National Cotton Council of America, The Cotton Foundation. <http://www.cotton.org/tech/ace/educational-opportunities.cfm> [Accessed December 6, 2018].

An, Y-Q., J.M. McDowell, S. Huang, E.C. McKinney, S. Chambliss, and R.B. Meagher. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10(1):107-121.

Anderson, H.M., D.J. Bowen, C.A. Chay, S. Flasiński, U.R. Kesanapalli, J.S. Milligan, R.N. Slightom and Y. Yin. 2015. Pesticidal toxin active against Coleopteran and/or Hemipteran insects. Patent 20150047076, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2001. Food safety: the priority classification system for food business. Lkd.

Arackal, S.M., C.W. Garnaat, K.R. Lawry, L.F. Ralston and Q. Tian. 2011. Molecular Characterization of Dicamba Glufosinate-Tolerant Cotton MON 88701. Monsanto Technical Report MSL0023280. St. Louis, Missouri.

Artim, L. 2002. Molecular characterization and genetic stability of event COT102. Syngenta Technical Report, MRID 458358-02, Syngenta Seeds, Inc., Wilmington, Delaware.

Ausubel, P. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc. New York.

Axelos, M., C. Bardet, T. Libox, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α : Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219:106-112.

Bairoch, A., and Boeckmann, B. 1993. The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments. *Nucleic Acids Research* Jul 1;21(13):3093-6.

Baker, H.G. 1965. Characteristics and Modes of Origin of Weeds. In: *Genetics of Colonizing Species*, Academic Press, New York, 147-172.

Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2:335-350.

Bartlett, S. G., Grossman, A. R., and Chua, N. H. 1982, *Methods in chloroplast molecular biology* Elsevier, Amsterdam.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Baum, J., Johnson, T., Carlton, B. 1999. *Bacillus thuringiensis*. Natural and recombinant bioinsecticide products. *Methods in Biotechnology*. 5, Ch. 12: 189-209.
- Baum, J.A., U.R. Sukuru, S.R. Penn, S.E. Meyer, S. Subbarao, X. Shi, S. Flasiniski, G.R. Heck, R.S. Brown and T.L. Clark. 2012. Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. *Journal of Economic Entomology* 105:616-624.
- Baumgarte, S., and Tebbe, C.C. 2005. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology* (2005) 14, 2539-2551.
- Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Nucleic Acids Research* S2:91-92.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. y Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, 19:327-336.
- Beasley, J.O. 1942. Meiotic chromosome behavior in species, species hybrids, haploids, and induced polyploids of *Gossypium*. *Genetics* 27:25C54.
- Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316:1185-1188.
- Benson, D., D. J. Lipman, and J. Ostell. 1993. "GenBank". *Nucl. Acids Res.* 21:2963-2965.
- Bentley, R. 1990. The Shikimate Pathway – A Metabolic Tree with Many Branches. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 307-384.
- Berg, G., N. Roskot and K. Smalla. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3594-3600.
- Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock and K. Smalla. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3328-3338.
- Berg, G., P. Marten and G. Ballin. 1996. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research* 151:19-27.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Berg, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4:430-435.
- Bevan, M., Barnes, W.M. y Chilton, M.D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucl. Acid Res.* 11(2): 369-385.
- Birch, A.N.E., Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Heckmann, L.H., Krogh, P.H., and Cortet, J. 2007. The role of laboratory, glasshouse and field scale experiments in understanding the interactions between genetically modified crops and soil ecosystems; A review of the ECOGEN project. *Pedobiologia* (2007), doi: 10.1016/j.pedobi.2007.04.008.
- Blackwood, C.B., and Buyer, J.S. 2004. Soil Microbial Communities Associated with Bt and Non-Bt Corn in Three Soils. *J. Environ. Qual.* 33:832-836.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene*, 2(1977) 95-133.
- Brubaker CL, Paterson AH, Wendel JF. 1999. Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *Genome* 42:184–203.
- Brubaker, C.L. and Wendel, J.F. 1994. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *American Journal of Botany* 81(10): 1309-1326.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem and R.L. Jones. 2000. Phenylpropanoid and phenylpropanoid-acetate pathway metabolites. Pages 1286-1289 in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland.
- Bulla, L.A., Kramer, K.J., and Davidson, L.I. 1977. Characterization of entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 130 (1977) 375-381.
- Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba \square -demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437:20-28.
- Chen, Y.R., A. Rivlin, A. Lange, X.D. Ye, Z. Vaghchhipawala, E. Eisinger, E. Dersch, M. Paris, B. Martinell and Y.C. Wan. 2014. High throughput *Agrobacterium tumefaciens*-mediated germline transformation of mechanically isolated meristem explants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 33:153-164.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- CONABIO. 2011. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010- Distribución conocida, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Datos obtenidos del Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB), registros comprendidos entre los años de 1879 y 2001 (registros no continuos). México.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G. and J. Lacape. 2014. Distribution and differentiation of wild feral and cultivated populations of perennial upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Mesoamerica and the Caribbean. PLoS ONE 9:1-19 e107458.
- Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase. EMBO Journal 3:1671-1679.
- Crecchio, C., and Stotzky, G. 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. Soil Biology and Biochemistry 30: 463-470.
- Crickmore, N., Wheeler, V.C., and Ellar, D.J. 1994. Use of an operon fusion to induce expression and crystallization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin encoded by a cryptic gene. Mol. Gen Genet (1994) 242: 365-368.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Daen, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 807-813.
- Cross, T. 1989. Other Genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Pages: 2586-2615.
- Cunha, B.A. 2010. *Stenotrophomonas maltophilia*. WebMD, LLC, New York, New York. <http://www.emedicine.com/med/topic3457.htm> [Accessed January 2, 2010].
- Dankocsik, C., Donovan, W.P., Jany, C.S. 1990. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. Mol. Microbiol. 4, 2087–2094.
- Davies, J. E. and Benveniste, R. E. 1974, "Enzymes that inactivate antibiotics in transit to their targets", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 235, no. 0, pp. 130-136.
- De Block, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J., and Zambryski, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. EMBO J. 1984 Aug; 3(8): 1681-9.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genetics*, 17, 193-199.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T., and Kishore, G. M. 1986. "Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 18, pp. 6873-6977.
- Denton, M. and K.G. Kerr. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:57-80.
- Denton, M., N.J. Todd, K.G. Kerr, P.M. Hawkey and J.M. Littlewood. 1998. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1953-1958.
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1:561-573.
- Doherty, S.C., Hamilton. K.A., Lirette, R.P. and Borokova, I. 2000. Amended Report for Molecular Characterization of Cotton Event 15985. Monsanto Technical Report MSL#16620. St. Louis, Missouri.
- Doherty, S.C., D.W. Mittanck, and R.P.Lirette. 2001. Confirmation of the Genomic DNA Sequences Flanking the 5' and 3' ends of the *cry2Ab2* Insert in Bollgard II Cotton Event 15985. Monsanto Technical Report MSL-17099. St. Louis, Missouri.
- Donovan, W.P., Dankocsik, C.C., Gilbert, M.P., Gawron-Burke, M.C., Groat, R.G., and Carlton, B.C. 1988. Amino Acid Sequence and Entomocidal Activity of the P2 Crystal Protein. *J. Biol. Chem.* 263 (1): 561-567.
- Donovan. W.P., C. Dankocsik, M.P. Gilbert, M.C. Gawron-Burke, R.G. Groat, and B.C. Carlton. 1989. Additions and Corrections. *J. Biol. Chem.* 264:4740.
- D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392:481-497.
- Dubelman, S., Martin, J.W., and Bhalgat, M.K. 2001. Aerobic soil degradation of the *Bacillus thuringiensis* insect protection protein 2 in cotton leaf tissue. *Monsanto Technical Report*, MSL 16185.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Duke, S.O. 1988. Glyphosate. p. 1-70. in Kearney, P.C. and D.D. Kaufman, eds. *Herbicides – Chemistry, Degradation, and Mode of Action*. Dekker, New York.
- Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392:498-510.
- Duncan, D.R. 2010. Cotton transformation. Pages 65-77 in *Cotton: Biotechnological Advances*. Volume 65. U.B. Zehr (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Duncan, D.R. and G. Ye. 2011. Methods for inducing cotton embryogenic callus. Patent 7,947,869, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Echemendia, Y. 2010. Microorganism of the month: *Stenotrophomonas maltophilia*. Environmental Microbiology Laboratory, Inc., Cherry Hill, New Jersey. <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-07-2007.html> [Accessed August 10, 2010].
- EPA. 1998. Registration Eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis* (Bt). EPA 738-R-98-004.
- EPA. 1994. Plant-pesticides; Proposed Exemption From the Requirement of a Tolerance Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic. 59 Fed. Reg. 60535.
- EPA. 1988. Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as the Active Ingredient. NTIS PB 89- 1 64 198.
- EPA. 2009. Correction to the amendments to the dicamba RED. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Washington, D.C.
- Eschenburg, S., Healy, M.L., Priestman, M.A., Lushington, G.H., and Schönbrunn, E. 2002. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta* (2002) 2016: 129-135.
- Fang, M., Kremer, R.J., Motavalli, P.P., and Davis, G. 2005. Bacterial Diversity in Rhizospheres of Nontransgenic and Transgenic Corn. *Appl Environ. Microbiol.* 71(7):4132-4136. doi: 10.1128/AEM.71.7.4132-4136.2005.
- Federici, B.A. 2002 Case study: Bt crops. A novel mode of insect resistance. Pages 165-200 In: *Bt crops and insect resistance*.
- Ferraro, D.J., L. Gakhar and S. Ramaswamy. 2005. Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and Biophysical Research and Communications* 338:175-190.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Fiorito, T.M., I. Icoz and G. Stotzky. 2008. Adsorption and binding of the transgenic plant proteins, human serum albumin, β -glucuronidase, and Cry3Bb1, on montmorillonite and kaolinite: Microbial utilization and enzymatic activity of free and clay-bound proteins. *Applied Clay Science* 39:142-150.
- Flavell, R.B., Dart, E., Fuchs, R.L. y Fraley, R.T. 1992. Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology* 10:141-144.
- Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13:7095-7106.
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:4803-4807.
- Fryxell, P. A. 1984. Taxonomy and Germplasm Resources. pp. 27-57. In Kohel, R. J. and Lewis, C. F., Editors. *Cotton*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. 605 pp.
- Fryxell, P.A. 1979. The origin and spread of the tribe. Pages 130-149 in *The Natural History of the Cotton Tribe (Malvaceae, Tribe Gossypieae)*. Texas A&M University Press, College Station, Texas.
- Fuchs, R. L. and Astwood, J.D. 1996. Allergenicity Assessment of Foods Derived from Genetically Modified Plants (1). In *Highlights in Food Allergy* (B. Wüthrich B. Ortolani, eds) S. Karger AG, Monographs in Allergy; 1996, Vol. 32, 105 -120) *Food Technology*, Feb. 1996, 83-88.
- Fuchs, R.L. 1994. Gene expression and compositional analysis from field-grown insect resistant cotton lines expressing full length *B.t.k.* HD-73 protein. Monsanto Technical Report, St. Louis, MO, USA.
- Garnaat, C.W., C. Duong, C. Kessenich, A. Silvanovich, and W. Urquhart. 2017. Amended Report for MSL0027259: Molecular Characterization of Insect Protected Cotton MON 88702. Monsanto Technical Report MSL0028391. St. Louis, Missouri.
- Gill, S.S., E.A. Cowles, y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78:73-84.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Glissen, L.J., Metz, P.L., Stiekema, W.J. and Nap, J.P. 1998. Biosafety of *E. coli* beta-glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Res*, 7, 157-63.

Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37:189-216.

Gowda, A., T.J. Rydel, A.M. Wollacott, R.S. Brown, W. Akbar, T.L. Clark, S. Flasiniski, J.R. Nageotte, A.C. Read, X. Shi, B.J. Werner, M.J. Pleau and J.A. Baum. 2016. A transgenic approach for controlling *Lygus* in cotton. *Nature Communications* 7:12213.

Gowda, S., Wu, F.C., and Shepherd, R.J. 1989. Identification of Promoter Sequences for the Major RNA Transcripts of Figwort Mosaic and Peanut Chlorotic Streak Viruses (Caulimovirus Group).

Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Birch, A.N.E., Scrimgeour, C., Andersen, M.N., Cortet, J., Messéan, A., Sausse, C., Lacroix, B., and Krogh, P.H. 2005. A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant and Soil* (2005) 275: 135-146.

Griffiths, B.S., Heckmann, L.H., Caul, S., Thompson, J., Scrimgeour, C., and Krogh, P.H. 2007. Varietal effects of eight paired lines of transgenic Bt maize and near-isogenic non-Bt maize on soil microbial and nematode community structure. *Plant Biotechnology Journal* 5, pp. 60-68.

Groat, J.R., Palmer, G.M., Rice, J.F., Reiser, S.E., Tian, Q. 2010. Amended Report for MSL-19580: Amended Report for MSL-18537: Molecular Analysis of Roundup Ready Flex Cotton MON 88913. Monsanto Technical Report MSL0022669. St. Louis, Missouri.

Groat, J.R. and J.D. Masucci. 2008. Southern Blot Analysis to Confirm the Presence of MON 531 and MON 1445 in the Combined-Trait Product MON 531 × MON 1445. Monsanto Technical Report MSL0021301. St. Louis, Missouri.

Harayama, S., M. Kok and E.L. Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology* 46:565-601.

Harrison, L., M. Bailey, M. Naylor, J. Ream, B.G. Hammond, D. Nida, y B. Burnette. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *Journal of Nutrition* 126:728-740.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Head, G., Surber, J., Watson, J., Martin, J. and Duan, J. 2002. No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use. *Environmental Entomology*. 31(1): 30-36.
- Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba \square -demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *Journal of Biological Chemistry* 280:24759-24767.
- Herman, R.A., J.D. Wolt and W.R. Halliday. 2002. Rapid degradation of the Cry1F insecticidal crystal protein in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:7076-7078.
- Hérouet, C., D.J. Esdaile, B.A. Mallyon, E. Debruyne, A. Schulz, T. Currier, K. Hendrickx, R.-J. van der Klis and D. Rouan. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134-149.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7:907-919.
- Hodal, L., Bocharde, A., Nielsen, J.E., Mattsson, O. and Okk, F.T. 1992. Detection, expression and specific elimination of endogenous beta-glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Sci.*, 87, 115-122.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H.V., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., and Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7844-7848.
- Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19: 15-38, 1992.
- Hopkins, D.W. and E.G. Gregorich. 2005. Decomposition of residues and loss of the \square -endotoxin from transgenic (*Bt*) corn (*Zea mays* L.) in soil. *Canadian Journal of Soil Science* 85:19-26.
- Horsch, R.B., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Sanders, P.R., Lloyd, A., and Hoffmann, N. 1984. Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. *Science* 223: 196-198.
- Hu, C.Y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, P.D. and O'Brien, W.T. 1990. Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant cell rep.*, 9, 1-5.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Hutchinson, J.B. 1951. Intra-specific differentiation in *Gossypium hirsutum*. *Heredity* 5:161-193.
- Icoz, I. and G. Stotzky. 2008a. Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. *Transgenic Research* 17:609-620.
- Icoz, I. and G. Stotzky. 2008b. Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 40:559-586.
- ILSI-CERA. 2011. A review of the environmental safety of the PAT protein. International Life Sciences Institute, Center for Environmental Risk Assessment, Washington, D.C. http://cera-gmc.org/docs/cera_publications/pub_05_2011.pdf.
- Janas, K.M., M. Cvikrová, A. Paągiewicz and J. Eder. 2000. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:587-593.
- Jefferson, R. A., Burges, S.M., and Hirsh, D. 1986. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:8447-8451.
- A. Jerga, D. Chen, C. Zhang, J. Fu, J.-L.K. Kouadio, Y. Wang, S.M.G. Duff, J.E. Howard, T.J. Rydel, A.G. Evdokimov, P. Ramaseshadri, A. Evans, R. Bolognesi, Y. Park, J.A. Haas, Mechanistic insights into the first *Lygus*-active β -pore forming protein, *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2016), doi: 10.1016/j.abb.2016.03.016.
- John, M.E. 1996. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: Reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. *Plant Molecular Biology* 30:297-306.
- John, M.E. 1997. Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering. In *Critical Reviews in Biotechnology*, 17 (3): 185-208.
- Juhnke, M.E. and E. des Jardin. 1989. Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Applied and Environmental Microbiology* 55:747-750.
- Juhnke, M.E., D.E. Mathre and D.C. Sands. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 53:2793-2799.
- Kaji, D.A., Rosato, Y.B., Perez-Canhos, V., and Priest, F.G. 1994. Characterization by Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Whole-Cell Proteins of Some *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Strains Isolated in Brazil. *Sys. Appl. Microbiol.* 17 (1): 104-107.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Kämpfer, P. 2006. The family *Streptomycetaceae*, Part I: Taxonomy. Pages 538-604 in *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea, Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Volume 3. M.Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). Springer+ Business Media, LLC., New York, New York.
- Kay, R.; Chan, A.; Daly, M. e McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*. 236:1299-1302.
- Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210:437-442.
- Kolwyck, D., K. Hamilton, and A. Reed. 1999. Cry1Ac, CP4 EPSPS and NPTII protein levels in cotton samples produced in the 1998 U.S. field trials. Monsanto Technical Report MSL 16243.
- Kolwyck, D., Hamilton, K., Reed, A., and R. Lirette. 2000. Amended Report for MSL-16081: Protein Levels in Insect Protected Cotton Samples produced in the 1998 U.S. Field Trials.
- Koskella, J., and Stotzky, G. 1997. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3561-3568.
- Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgette and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5:149-163.
- Krueger, J.P., R.G. Butz, Y.H. Atallah and D.J. Cork. 1989. Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37:534-538.
- Kutzner, H.J. 1981. The family streptomycetaceae. Pages 2028-2090 in *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Volume 2. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H.G. Schlegel (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Lambert, B., F. Leyns, L. Van Rooyen, F. Gosselé, Y. Papon and J. Swings. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Applied and Environmental Microbiology* 53:1866-1871.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Lee, J.A. 1984. Cotton as a world crop. Pages 1-25 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- Lege, K.E., J.T. Cothren and C.W. Smith. 1995. Phenolic-acid and condensed tannin concentrations of six cotton genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 35:241-249.
- Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera. Pages 2451-2508 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 4. S.T. Williams and M.E. Sharpe (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244:440-444.
- Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by Phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. *Journal of Plant Physiology* 123:135-142.
- Mitsky, T.A. 1993. Comparative alignment of CP4 EPSPS to known allergenic and toxic proteins using FASTa algorithm. Monsanto Technical Report, MSL-12820.
- Mogen, B.D., M.H. MacDonald, R. Graybosh and A.G. Hunt. 1990. Upstream sequences other than AAUAAA are required for efficient messenger RNA 3'-end formation in plant. *The Plant Cell* 2:1261-1272.
- Naylor, M.W. 1993. Acute Oral Toxicity Study of CP4 EPSPS Protein in Albino Mice, Monsanto Technical Report, MSL-13077.
- Nester, E., Thomashow, L., Metz, M. and Gordon, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. *American Academy of Microbiology*: 1-22. Disponible en: www.asmusa.org.
- Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73:9080-9088.
- Nunes, F.V. and I.S. de Melo. 2006. Isolation and characterization of endophytic bacteria of coffee plants and their potential in caffeine degradation. *Environmental Toxicology* 10:293-297.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Odell, J.T., Mag, F. y Chua, H.H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. ENV/JM/MONO(99)9 Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.10. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD. 2002. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 25 Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate-ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. ENV/JM/MONO(2002)14. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD. 2008. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Oshima, A., Kyle, J.W., Miller, R.D., Hoffmann, J.W., Powell, P.P., Grubb, J.H., Sly, W.S., Tropak, M., Guise, K.S., and Gravel, R.A. 1987. Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -glucuronidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:685-689.
- Padgett, S.R., Barry, G.F., Re, D.B., Eichholtz, D.A., Weldon, M., Kolacz, K., and Kishore, G.M. 1993. Purification, Cloning, and Characterization of a Highly Glyphosate-tolerant 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4. Monsanto Scientific Literature. Report MSL-12738.
- Palleroni, N.J. and J.F. Bradbury. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43:606-609.
- Palomo Gil, Arturo. 1996. Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia Páginas* 359-369. Academia Mexicana de Ciencias. México, D.F.
- Pigott, C.R. and D.J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71:255-281.
- Pineda, N. G, D.W. Mittanck, T. A. Cavato, and R.P.Lirette. 2002. PCR and DNA Sequence Analysis of the Insert in Bollgard II Cotton Event 15985. Monsanto Technical Report MSL-17146. St. Louis, Missouri.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Rapp, R.A., C.H. Haigler, L. Flagel, R.H. Hovav, J.A. Udall and J.F. Wendel. 2010. Gene expression in developing fibres of Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) was massively altered by domestication. *BMC Biology* 8:139.
- Ream, J.E. 1994. Aerobic Soil Degradation of Truncated *B.t.k.* Delta Endotoxin HD-1. Monsanto Technical Report, MSL 13986.
- Reiser, S., Beazley, K., Petersen, E., Hillyard, J., Cavato, T., and Lirette, R. 2001. Additional Molecular Characterization of Bollgard Cotton Event 531. Monsanto Technical Report MSL-16882, St. Louis, MO.
- Rensing, S.A. and U.G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution* 39:80-86.
- Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15:8451-8466.
- Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Ruiz-Corral, J.A.; Medina-García, G.; Ortiz-Trejo, C.; Martínez-Parra, R.; González Acuña, I.J.; Flores-López, H.; Byerly-Murphy, K.F. 1999. Requerimientos agroecológicos de cultivos. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, INIFAP, SAGAR. Guadalajara, Jal., México.
- Ryan, R.P., S. Monchy, M. Cardinale, S. Taghavi, L. Crossman, M.B. Avison, G. Berg, D. van der Lelie and J.M. Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7:514-525.
- Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Lüthy, P. and Wolfersberger, M.G. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ -gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Letters*, 204, 213-218.
- Sanger M, Daubert S and Goodman RM. 1990. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus – comparison with the analogous-35s promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol Biol* 14: 433 - 443.
- Schlaman, H.R., Risseeuw, E., Franke-van Dijk, M.E. and Hooykaas, P.J. 1994. Nucleotide sequence corrections of the uidA open reading frame encoding beta-glucuronidase. *Gene*, vol. 138, pp. 259-260.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Schmelz, E.A., J. Engelberth, H.T. Alborn, P. O'Donnell, M. Sammons, H. Toshima and J.H. Tumlinson. 2003. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10552-10557.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 775-806.
- Schuler, M. A., E. S. Schmitt, and R. N. Beachy. 1982. Closely related families of genes code for Alpha and Alpha Prime subunits of the soybean 7s storage protein complex. *Nucl. Acids Res.* 10:8225-8244.
- Schulz, A., A. Kruper, y N. Amrhein. 1985. Differential sensitivity of Bacterial 5-enopyruvylskikimate-3-Phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS microbiol. lett* 28:297-301.
- Schulz, M. and Weissenbock, G. 1987. Dynamics of the tissue-specific metabolism of luteolin glucuronides in the mesophyll of rye primary leaves (*Secale cereale*). *Z. Naturforsch.*, 43c, 187-193.
- Serdy, F.S., Ream J.E. and Fuchs, R.L. 1994. Petition for determination of Non-regulated Status: Bollgard™ Cotton Line 531 (*Gossypium hirsutum* L.) with the gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.
- Sims, S.R. 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* [Cry1A(C)] protein expressed in transgenic cotton: Effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist* Vol. 20, No. 4, pp. 493-500.
- Sims, S.R. and J.E. Ream. 1997. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* CryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: Laboratory microcosm and field studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1502-1505.
- Sims, S.R. and L.R. Holden. 1996. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry1A(b) protein in corn tissue. *Environmental Entomology* 25:659-664.
- Sleisenger, M.H., and Fordtran, J.S. 1989. *Gastrointestinal Disease: Pathophysiology Diagnosis Management*. 4th Ed. W.B. Saunders Company.
- Smith, C.W. 1995. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Pages 287-349 in *Crop Production: Evolution, History, and Technology*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Stalker, D.M., C.M. Thomas, and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* 181:8-12.
- Steinrücken, H. C. and Amrhein, N. 1980, "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 94, no. 4, pp. 1207-1212.
- Stotzky, G. 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil* 266:77-89.
- Sutcliffe, J.G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(8) 3737-3741.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 43:77-90.
- Swings, J., P. De Vos, M. Van den Mooter and J. De Ley. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33:409-413.
- Tapp, H., Calamai, L., and Stotzky, G. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biol. Biochem.* 26(6): 663-679.
- Tapp, H. and Stotzky, G. 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5): 1786-1790.
- Tapp, H. and Stotzky, G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 30: 471-476.
- Taylor, J.P., J.R. Groat, A.J. Whetsell, N.K. Scanlon, Q. Tian and J.D. Masucci. 2009. Amended Report for MSL-20168: Southern Blot Analyses to Confirm the Presence of MON 88913 and MON 15985 in the Combined Trait Product MON 88913 × MON 15985. Monsanto Technical Report MSL0022368. St. Louis, Missouri.
- Tempe, J. and Schell, J. *In: Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides*, A.B. Legocki, Ed. (Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 1977) p.416.
- Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. *EMBO Journal* 6:2519-2524.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Trolinder, N. L. and J.R. Goodin. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*. 6:231-234.
- Ulloa, M., Stewart, J. McD., Garcia-C, E. A., Godoy-A., S., Gaytan-M, A., and Acosta N., S. 2006. Cotton genetics resources in the western states of Mexico: *in situ* conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation. *Genetics Resources and Crop Evolution* (2006) 53: 653 - 668.
- Umbeck, P., G. Johnson, K. Barton, and W. Swain. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology*. 5:263-266.
- USDA. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Pesticide Fact Sheet.
- Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111:1-12.
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D., and Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins. *Applied and environmental microbiology*:1378-1385.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., and Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur J Biochem*, 186: 239-247.
- Venkateswerla, G. and G. Stotzky. 1992. Binding of the Protoxin and Toxin Proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on Clay Minerals. *Current Microbiol.* 25:225-233.
- Vieira, J. and Messing, J. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153:3-11.
- Waksman, S.A. and A.T. Henrici. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 46:337-341.
- Wang, C., and Touster, O. 1972. Studies of Catalysis by beta-Glucuronidase. The Effect of Structure on the Rate of Hydrolysis of Substituted Phenyl-beta-D-Glucoopyranosiduronic Acids, *J Biol Chem* 247, 2650.
- Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1623-1626.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14:1274-1278.
- Wendel, J.F. and Cronn, R.C. 2003. Polyploidy and the evolutionary history of cotton.
- Widner, W.R. and Whiteley, H.R. 1990. Location of the Dipteran Specificity Region in a Lepidopteran-Dipteran Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 172(6) 2826-2832.
- Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift für Naturforschung* 39:500-504.
- Winter, J., R. Wright, N. Duck, C. Gasser, R. Fraley and D. Shah. 1988. The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl₂ stress. *Molecular and General Genetics* 211:315-319.
- Wishart, D.S. 2010. Human metabolome database. www.hmdb.ca [Accessed June 2, 2010].
- Wishart, D.S., C. Knox, A.C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D.D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J.A. Cruz, E. Lim, C.A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhtudinov, L. Li, H.J. Vogel and I. ForSYNhe. 2009. HMDB: A knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research* 37:D603-D610.
- Wolfersberger, M.G., Hofmann, C. and P. Luthy. 1986. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin with Membrane Vesicles Isolated from Lepidopteran Larval Midgut; In *Bacterial Protein Toxin and Falmagne, P., Fehrenbech, F.J., Jeljaszewics, J. and Thelestam, M., eds. Gustav Fisher, NY pp. 237-238.*
- Wozniak, c.A. and L.D. Owens. 1994. Native B-glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant* 90: 763-77 1.
- Yabe, N., T. Takahashi and Y. Komeda. 1994. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene *HSP81*. *Plant and Cell Physiology* 35:1207-1219.
- Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* 20:773-786.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1:361-370.

II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM.

II.a. Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.

Para el ciclo PV-2024, se proveen 15 predios candidatos que podrán ser seleccionados para llevar a cabo las evaluaciones descritas en los **ANEXOS 1 y 2**, en Etapa Experimental del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

De los predios candidatos se seleccionarán y sembrarán un máximo de 4 predios para ejecutar, en cada uno de ellos los Protocolos 1 y 2, descritos en los **ANEXOS 1 y 2**, respectivamente.

Para realizar el Protocolo 1 se solicitan 0.2 ha totales y 5.6 kg de semilla de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (Con esta superficie y semilla se sembrarán los 4 predios de evaluación).

Para realizar el Protocolo 2 se solicitan 0.8 ha totales y 24.64 kg de semilla de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (Con esta superficie y semilla se sembrarán los 4 predios de evaluación).

En total se sembrará 1 hectárea de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 con 30.24 kg de semilla (0.25 ha y 7.56 kg de semilla por cada predio).

II.b. Ubicación del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.

Para el ciclo PV-2024, se proveen 15 predios candidatos que podrán ser seleccionados para llevar a cabo las evaluaciones descritas en los **ANEXOS 1 y 2**, en Etapa Experimental del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Los predios se localizan en los municipios de Matamoros, Reynosa, Río Bravo y Valle Hermoso, en el estado de Tamaulipas, dentro de la ecorregión nivel IV *Planicie Costera Tamaulipeca*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

CONSULTA INDÍGENA.

Como parte del proceso de trámite del permiso para la liberación al ambiente en Etapa Experimental que se solicita, está considerada la práctica de la consulta pública y, en particular, la consulta a los pueblos y comunidades indígenas de la zona en la cual se pretende la autorización. Al efecto, me permito apuntar algunas consideraciones normativas, como marco de referencia sobre el valor y obligatoriedad de la consulta y sus resultados.

Por mandato legal, es la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) quien establece los mecanismos para la realización de las consultas y participación de los pueblos y comunidades indígenas que pertenecen a la zona en la cual se solicita el permiso², a través de su Secretaría Ejecutiva³. Este organismo tendrá la facultad y la responsabilidad de ejecutar la consulta a las comunidades indígenas a la luz de lo dispuesto en el Artículo 99 de las Reglas de Operación de la CIBIOGEM, es decir; *“en un lenguaje comprensible y a través de los medios a los que tienen acceso, buscando la participación de los pueblos y comunidades indígenas”*.

Como marco jurídico y conceptual para llevar a cabo las consultas referidas; la CIBIOGEM deberá atender lo dispuesto por el Convenio 169 de la Organización Internacional del Trabajo (OIT) sobre Pueblos Indígenas y Tribales en Países Independientes, adoptado por México por decreto promulgatorio del 27 de junio de 1989, en el cual en el numeral 2, de la Parte I del Artículo 6 establece que:

“2. Las consultas llevadas a cabo en la aplicación de este Convenio deberán efectuarse de buena fe y de una manera apropiada a las circunstancias, con la finalidad de llegar a un acuerdo o lograr el consentimiento acerca de las medidas propuestas.”

Al respecto, es de destacar que de un análisis del texto transcrito se desprende que estas deberán “efectuarse de buena fe y de manera apropiada a las circunstancias”, es decir, que para realizarlas las autoridades responsables deberán adaptarse a la situación particular y realidades de cada comunidad. Este precepto reconoce que cada comunidad indígena o tribal

² (1) Art. 108 párr. 4 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados – “(...) La CIBIOGEM, además, realizará los estudios y las consideraciones socioeconómicas resultantes de los efectos de los OGMs que se liberen al ambiente en el territorio nacional, y establecerá los mecanismos para realizar la consulta y participación de los pueblos y comunidades indígenas asentadas en las zonas donde se pretenda la liberación de los OGMs, considerando el valor de la diversidad biológica. (...)”

(2) Art. 54 del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados – “(...) La consulta y participación de los pueblos y comunidades indígenas asentadas en las zonas donde se pretenda la liberación de los OGMs se realizará de conformidad con los mecanismos que para el efecto determine la CIBIOGEM.”

(3) Art. 5 fracc. XIV del Reglamento de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados – “(...) XIV. Definir y acordar los estudios y las consideraciones socioeconómicas que deban realizarse para conocer los efectos de los OGMs que se liberen al ambiente en el territorio nacional, y establecer los mecanismos para realizar la consulta y participación de los pueblos y comunidades indígenas asentadas en las zonas donde se pretenda liberar OGMs en su caso, en coordinación con las autoridades competentes; (...)”

³ (1) Art. 9 fracc. IX. – “(...) Conducir, coordinar y operar los mecanismos de participación que establezcan las reglas de operación de la CIBIOGEM en los términos que establecen las disposiciones aplicables; (...)”

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

es diferente, en la cual imperan usos y costumbres propios que crean una identidad entre los miembros de la misma. Las autoridades deberán conocerlas y adaptar los mecanismos de consulta a cada comunidad, sin generalizar en la manera de hacerlo y actuando caso por caso, pero siempre observando el principio de buena fe, proporcionando información objetiva y sin sesgos, para que la comunidad tome la mejor decisión.

Lo anterior, con la finalidad de que la comunidad llegue a un acuerdo respecto al tema consultado. Como *finalidad* debemos entender el “fin con que o por qué se hace algo”⁴. Es el motivador, la base y la intención última de la persona o institución que acciona una consulta. El actuar de las instituciones debe estar motivado por la intención y ánimo de que en la consulta se tomen decisiones y ejecutar todas las medidas necesarias para que las comunidades cuenten con la información completa y entendible, y que en consecuencia tengan la posibilidad de llegar a un acuerdo respecto al tema consultado. Esta *finalidad* se refiere a la manera o intención con la cual las autoridades o instituciones deben de hacer la consulta, en ningún momento implica que el resultado de la consulta en sí misma sea necesariamente llegar a un acuerdo para que pueda considerarse válida.

Lo anterior, no presupone la obligatoriedad de obtener una aprobación o consentimiento en la consulta a los pueblos indígenas, sino la intención de llegar a acuerdos con las mismas comunidades y que éstas sean tomadas en cuenta. Esta misma interpretación se encuentra establecida en el propio Manual para los Mandantes Tripartitos de la OIT para Comprender el Convenio sobre Pueblos Indígenas y Tribales 1989 (núm. 169) publicado por la Oficina Internacional del Trabajo en Ginebra, Suiza; que indica dentro de su Sección 2 respecto a la consulta y participación, que lo establecido en el Convenio 169 no proporciona un derecho de veto a los pueblos indígenas ya que “*alcanzar un acuerdo o lograr el consentimiento es el propósito al iniciar el proceso de consulta, y no un requisito independiente*”.

Bajo esta tesitura, la realización de la consulta a los pueblos o comunidades indígenas que en su caso efectúe la CIBIOGEM no presupone en ningún momento que el resultado de ésta sea vinculante para la autoridad resolutora del permiso, cualquiera que éste sea. Esto es, la autoridad podrá tomar en cuenta el resultado de la consulta para el establecimiento de medidas de bioseguridad, pero no podrá fundar la resolución de un permiso en el solo resultado de la consulta. Así mismo, la CIBIOGEM deberá atender al marco jurídico vigente para la coordinación y operación de este mecanismo de participación acotando su actuar al mismo, y no podrá establecer para la validez o ejecución de las consultas, mayores requisitos que los ya estipulados en las Leyes federales y locales, la Constitución Mexicana o los Tratados Internacionales.

⁴ Definición de la Real Academia de la Lengua Española

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Esto es consistente con lo establecido en la fracción IX, del apartado B del artículo 2° de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, donde en materia de consulta a los pueblos indígenas, establece que, **en su caso**, se incorporen las recomendaciones y propuestas que realicen⁵.

Así mismo, la resolución del permiso que por este medio se solicita no deberá depender ni de la realización de la consulta ni del resultado de la misma, ya que la misma legislación en su Artículo 52 indica que la resolución del permiso para la liberación al ambiente de OGMs en **Etapa Experimental** **deberá** expedirse en un plazo máximo de **seis meses** y del **Programa Piloto** **deberá** expedirse en un plazo máximo de **tres meses** contados a partir del día siguiente en que esta Autoridad haya recibido la solicitud del permiso y la información **aportada por el interesado** esté completa. Esto es, que la resolución de la solicitud de permiso deberá darse independientemente que la CIBIOGEM ejerza o no su facultad de realizar las consultas a los pueblos indígenas que considere necesarias. Máxime si el propio ordenamiento legal en su Artículo 35 indica que los plazos establecidos para la resolución de los permisos de liberación al ambiente (ya sea experimental o en programa piloto) serán prorrogables cuando no se cuente con la autorización de la SSA siempre que sea necesaria esta autorización. En el caso que nos ocupa, esta autorización no es necesaria, y el precepto legal no establece como condición de prórroga de los plazos, que no se cuente con el resultado de las consultas y participación de los pueblos y comunidades indígenas.

En consecuencia, esta H. Autoridad debe constreñir su actuar durante el proceso a lo estrictamente establecido en el marco jurídico relativo a biotecnología, y la resolución del permiso solicitado debe fundarse en la legislación aplicable y en la información técnica y científica disponible dentro de los plazos indicados por la Ley, sin que haya lugar a ninguna interpretación más allá de lo establecido en la letra de la propia legislación; independientemente de que la CIBIOGEM ejerza la facultad de realizar la consulta a los pueblos indígenas dentro del plazo establecido para la resolución del permiso solicitado o del resultado de la misma (al no ser vinculante para la autoridad).

METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA DEFINICIÓN DE ÁREAS SIN PRESENCIA INDÍGENA.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS.

Los predios propuestos para las evaluaciones experimentales se ubican dentro de la región agrícola al norte de Tamaulipas, que principalmente abarca los municipios de Matamoros, Reynosa, Río Bravo y Valle Hermoso (Figura 27).

⁵ Art 2°, apartado B, fracc. IX de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos – “(...) Consultar a los pueblos indígenas en la elaboración del Plan Nacional de Desarrollo y de los planes de las entidades federativas, de los Municipios y, cuando proceda, de las demarcaciones territoriales de la Ciudad de México y, en su caso, incorporar las recomendaciones y propuestas que realicen.”

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

En el estado de Tamaulipas no se encuentran pueblos indígenas originarios conforme a la información publicada por el Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas (INPI) (Fuente: <https://atlas.inpi.gob.mx/>).



Figura 27. Distribución de los Pueblos Indígenas Originarios en México de acuerdo con el INPI. En el estado de Tamaulipas no se encuentran pueblos indígenas originarios.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

En la Figura 28 se muestra la localización geográfica de los predios candidatos. En la Figura 29 se muestran los municipios donde se localizan los predios candidatos. En la Figura 30 se muestran las zonas agrícolas donde se localizan los predios candidatos. Además, en la Figura 31 se muestra que ninguno de los predios candidatos se localizan Áreas Naturales Protegidas.

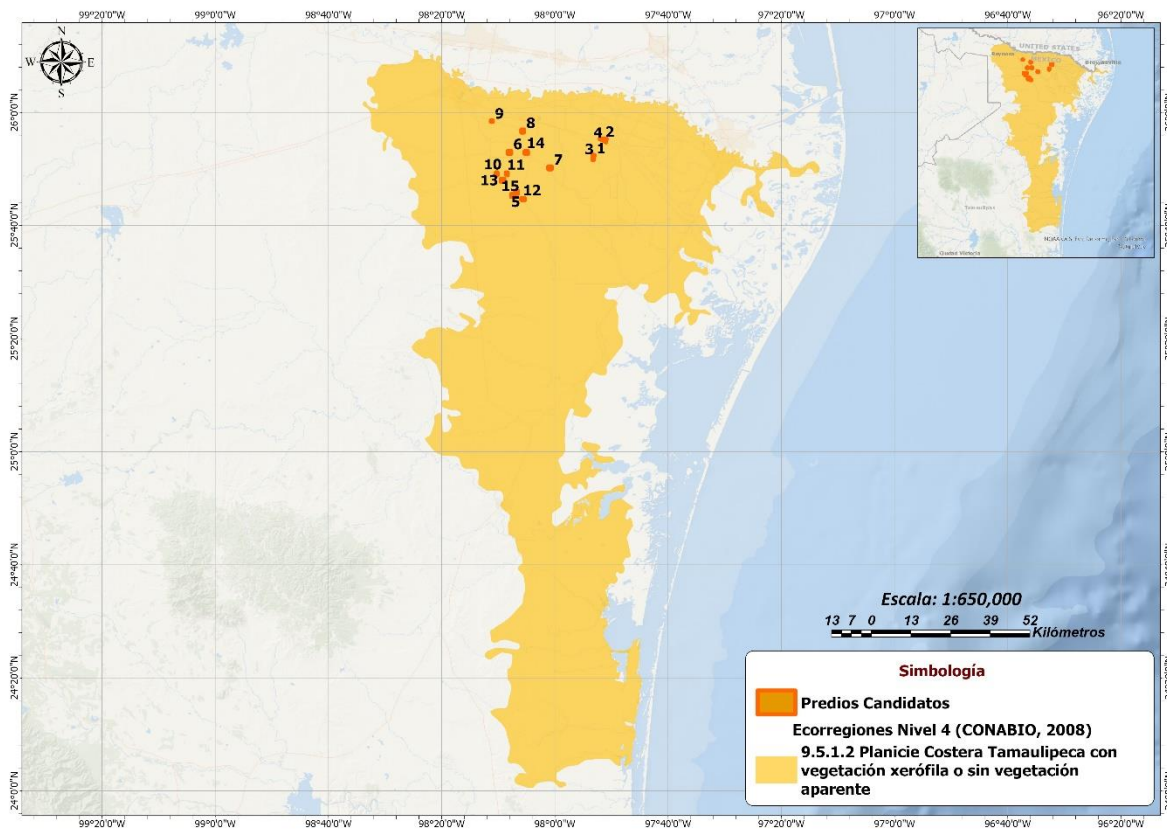


Figura 28. Localización geográfica de los predios candidatos en la Ecorregión 9.5.1.2. Planicie Costera Tamaulipeca, propuestos para las evaluaciones en Etapa Experimental.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

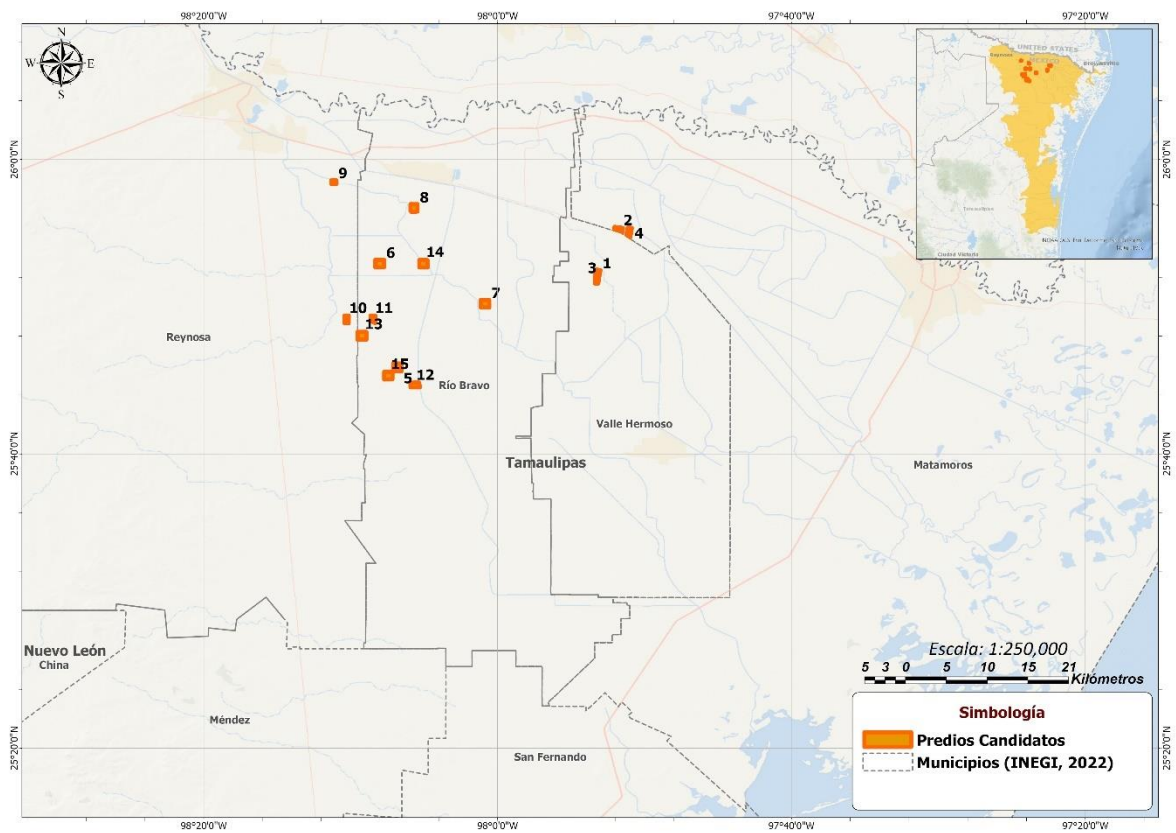


Figura 29. Municipios donde se ubican los predios candidatos en la Ecorregión 9.5.1.2. *Planicie Costera Tamaulipeca*, propuestos para las evaluaciones en Etapa Experimental.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

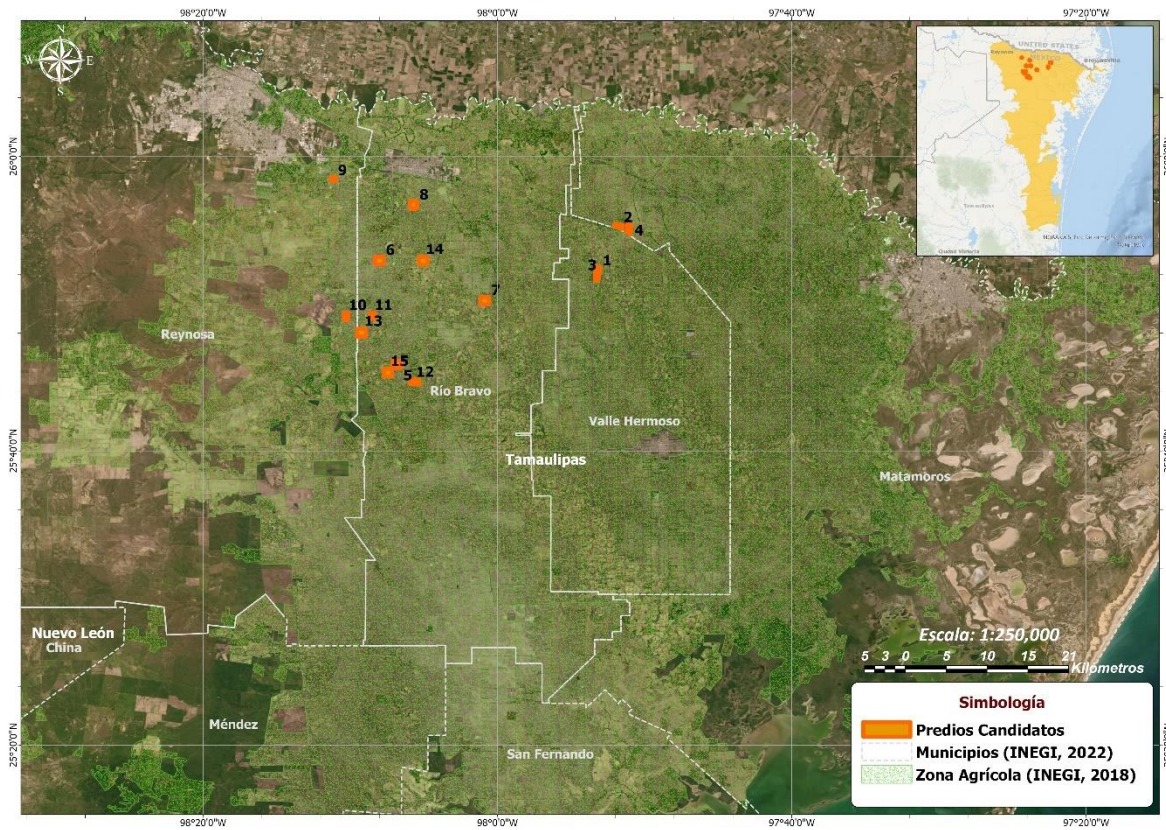


Figura 30. Zonas Agrícolas donde se ubican los predios candidatos en la Ecorregión 9.5.1.2. *Planicie Costera Tamaulipeca*, propuestos para las evaluaciones en Etapa Experimental.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

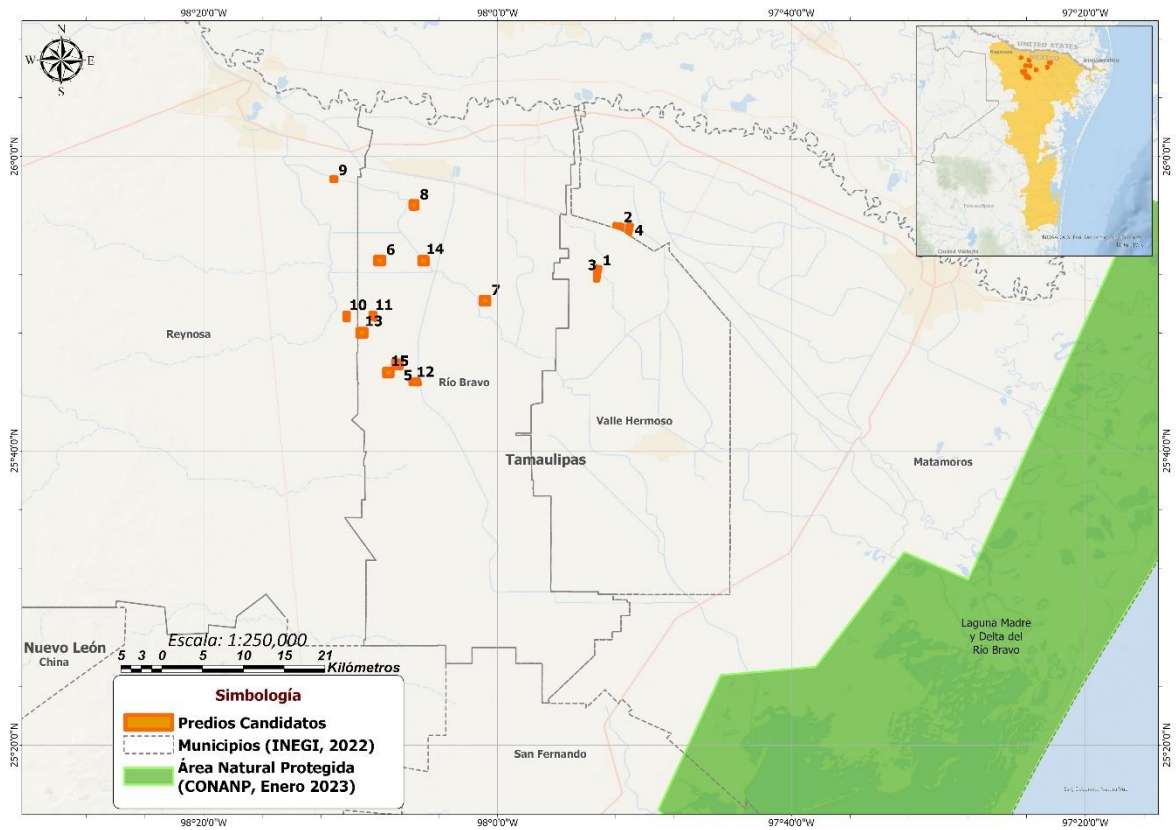


Figura 31. Ninguno de los predios candidatos se localizan dentro de Áreas Naturales Protegidas.

II.c. Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas según características de diseminación.

Para el ciclo PV-2024, se proveen 15 predios candidatos que podrán ser seleccionados para llevar a cabo las evaluaciones descritas en los **ANEXOS 1 y 2**, en Etapa Experimental del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Los predios se localizan en los municipios de Matamoros, Reynosa, Río Bravo y Valle Hermoso en Tamaulipas, dentro de la ecorregión nivel IV *Planicie Costera Tamaulipeca*.

II.c.1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas.

Como se explica en la sección I. **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**, en el apartado I.c. **Existencia de especies sexualmente compatibles** (Págs. 49-53), de las 50 especies reportadas del género *Gossypium* (5 tetraploides y 45 diploides), solo cuatro son sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*G. hirsutum*), que conforma la quinta especie. Los híbridos obtenidos entre el algodón cultivado, *Gossypium hirsutum* (tetraploide), y las especies diploides del género *Gossypium* son raros y, cuando estos ocurren, los híbridos resultantes son estériles. De las cuatro especies tetraploides compatibles, tres están geográficamente aisladas de México (*G. darwinii*, *G. mustelinum* y *G. tomentosum*) y de la producción comercial de algodón y, por esta razón, es altamente improbable que se crucen con *G. hirsutum*. La hibridación entre *G. hirsutum* y *G. barbadense* está limitada por barreras biológicas (diferencias estructurales de cromosomas que causan la eliminación de genes del progenitor y combinaciones de genes que pueden resultar letales). Entonces, el flujo génico desde *G. hirsutum* a las cuatro especies tetraploides relacionadas es limitada y se considera insignificante.

Se realizó una búsqueda en la base de datos de CONABIO (SEMARNAT) para identificar las especies reproductivamente compatibles con el algodón tetraploide MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (*G. hirsutum*) en la ecorregión *Planicie Costera Tamaulipeca* (Tamaulipas Norte), mediante sistemas de información geográfica. Los resultados de esta búsqueda fueron que:

Se encontraron seis colectas de la especie *G. hirsutum* (tetraploide) en la base de datos de CONABIO (US National Plant Germplasm System). Una colecta se localizó en la localidad de Ladrillera, Municipio de San Fernando, a una distancia de más de 100 Km al predio candidato más cercano (Tamaulipas 5) propuesto para las evaluaciones experimentales de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Las colectas restantes se localizaron en las cercanías de la Laguna Madre al norte del Municipio Soto La Marina, a una distancia aproximada de 165 Km al predio candidato más cercano (Tamaulipas 5) (Figura 15).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

II.c.2. Descripción geográfica.

Descripción de la Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca*.

Características climatológicas

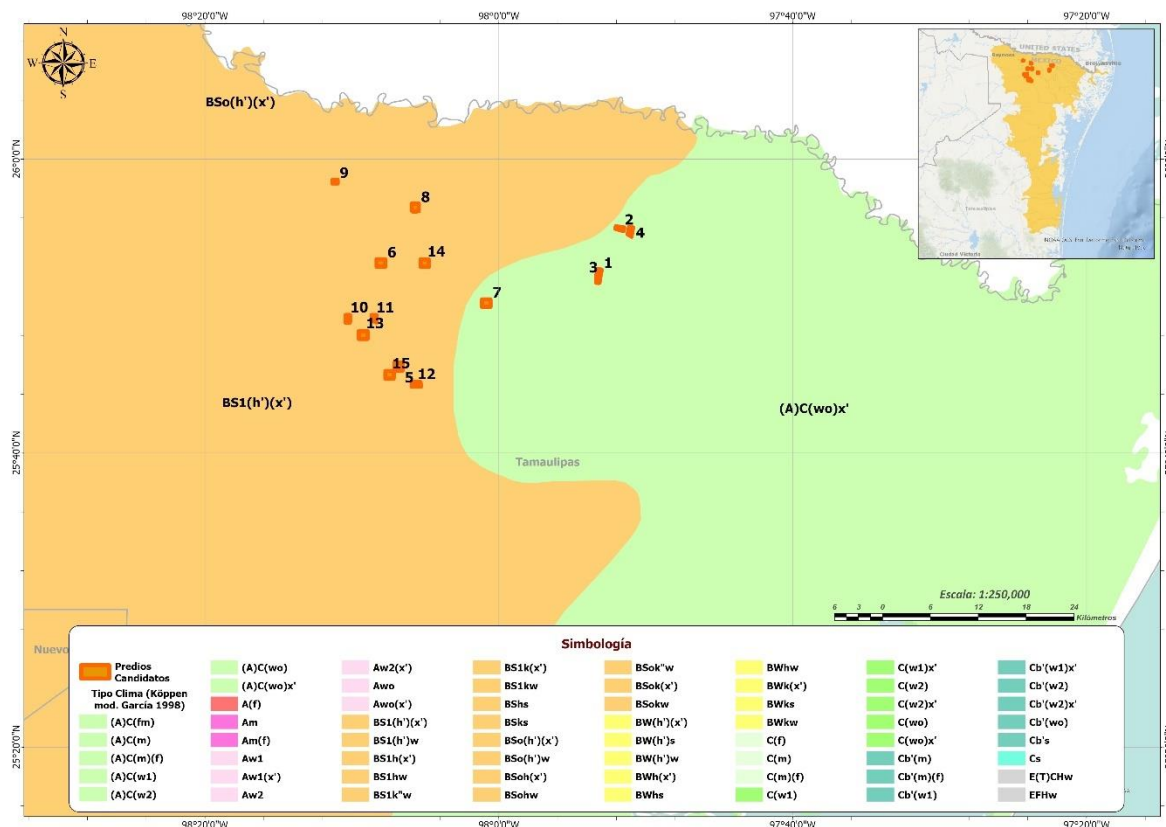


Figura 32. Tipos de clima. Los predios propuestos en los municipios de Reynosa y Río Bravo se ubican en una zona de clima semiárido, cálido BS1(h')(x'), con temperatura media anual mayor a 22°C, con una temperatura mayor a 18°C en el mes más frío. Las lluvias se presentan a lo largo del año y el porcentaje de lluvia invernal es mayor al 18% del total anual. El resto de los predios situados en los municipios de Valle Hermoso y Matamoros y el predio 7 en el municipio de Río Bravo, se ubican en una zona climática (A)C(wo)x', semicálido subhúmedo del grupo C, con temperatura media anual mayor a 18°C. La temperatura del mes más frío es menor a 18°C, mientras la temperatura del mes más caliente es mayor a 22°C. Las lluvias del mes más seco son menores de 40 mm, la lluvia invernal tiene un porcentaje mayor a los 10.2% del total anual. (Köppen mod. García, 1998).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Características Geomorfológicas

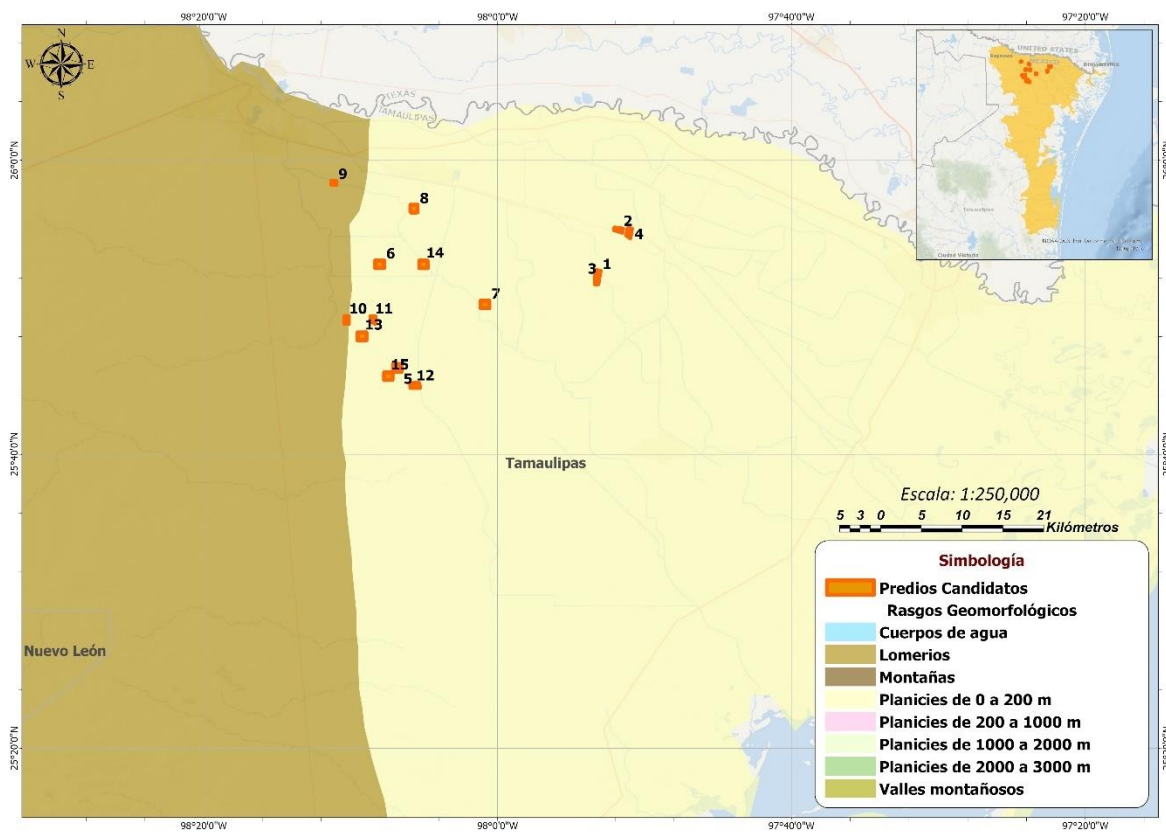


Figura 33. Características Geomorfológicas. 14 de los predios candidatos se ubican sobre planicies con una altura de 0-200 m.s.n.m. y solo el predio Tamaulipas 9 se localiza sobre lomerios (Lugo-Hubp et al., 1992).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Altimetría

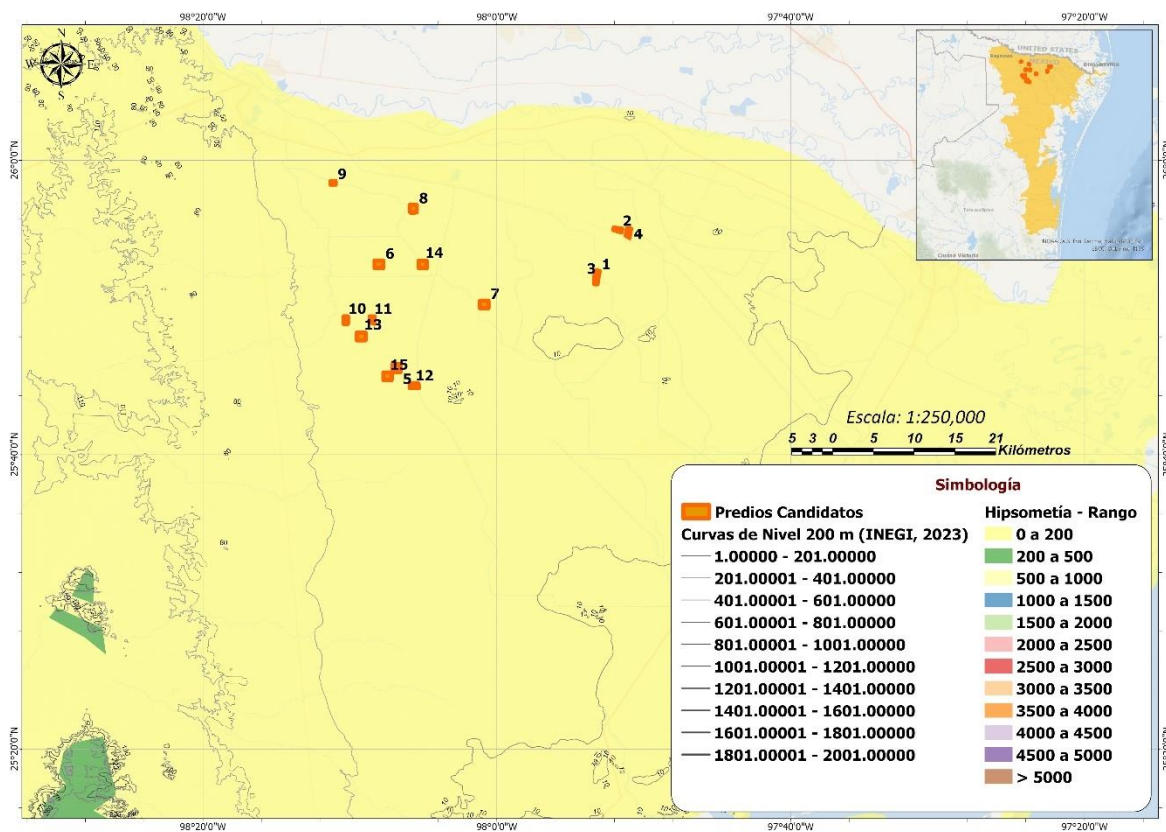


Figura 34. Altimetría. Los predios propuestos se ubican en una altitud entre los 0 y 100 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (INEGI, 20023).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Fallas y Fracturas

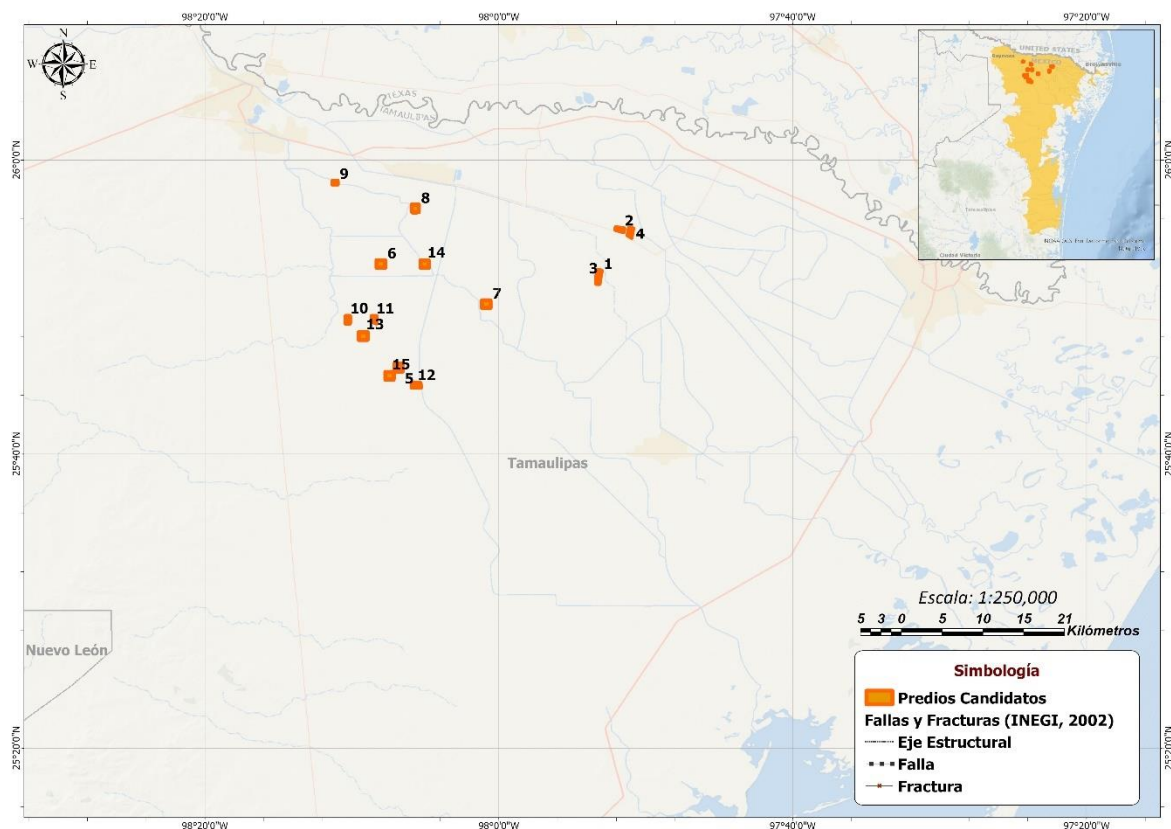


Figura 35. Fallas y Fracturas. Ninguno de los predios propuestos se ubica sobre una falla o fractura. La fractura más cercana se ubica a 42 km al noroeste del predio Tamaulipas 9 que se encuentra en el municipio de Reynosa (INEGI, 2002).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Litología

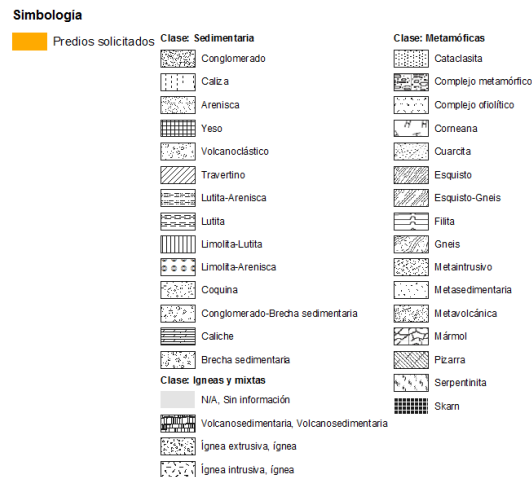
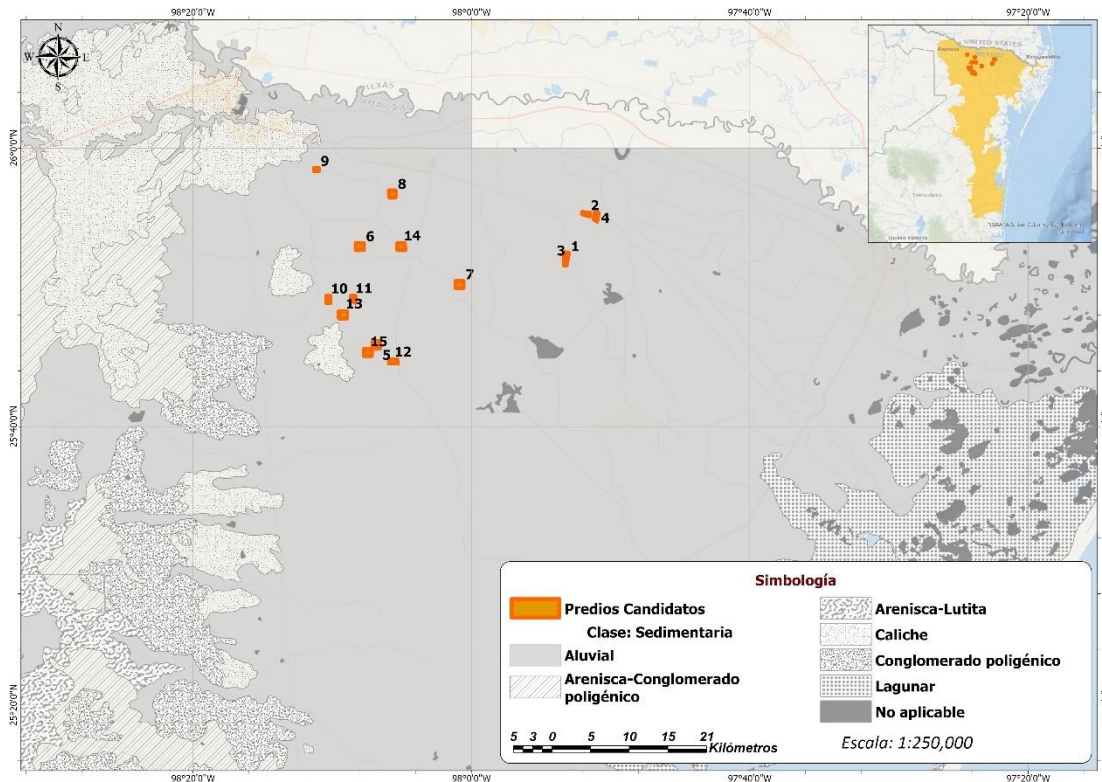


Figura 36. Litología. En la región norte de Tamaulipas predominan rocas sedimentarias principalmente aluvial y arenisca-lutita (SGM, CGMinería y SE, 2003).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Características Edáficas

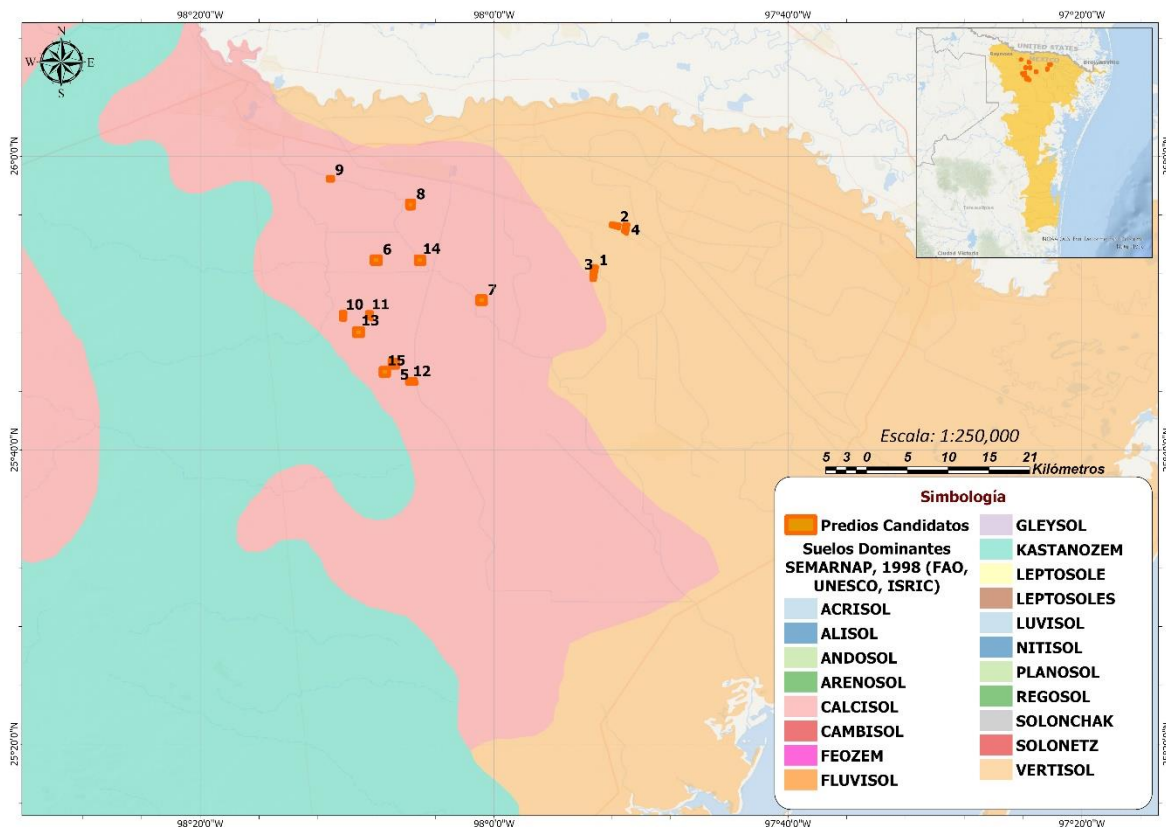


Figura 37. Suelo. La mayoría de los predios se ubican sobre un tipo de suelo calcisol haplico. Estos suelos calcáreos se distinguen por presentar una capa dura de caliche a menos de un metro de profundidad, una gran cantidad de calcio y, a menudo, una capa ócrica, características que los convierten en suelos secos e infértiles. Los calcisoles se desarrollan bajo climas áridos. El riego por surcos es más eficiente en suelos calcáreos apagados y el riego por aspersión y curvas de nivel son alternativas más eficaces en tierras onduladas. Los predios 1-4 se localizan sobre un tipo de suelo vertisol eutrico. Estos son suelos sumamente arcillosos que se desarrollan en climas de subhúmedos a secos. Son profundos, muy duros cuando están secos y lodosos al mojarse (debido a su alto contenido de arcillas), por lo que resulta difícil trabajarlos. Además, su fertilidad es intrínsecamente baja. (SEMARNAT, 2002) (IUSS Working Group WRB, 2015).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Usos de suelo y cubierta vegetal (INEGI, 2018)

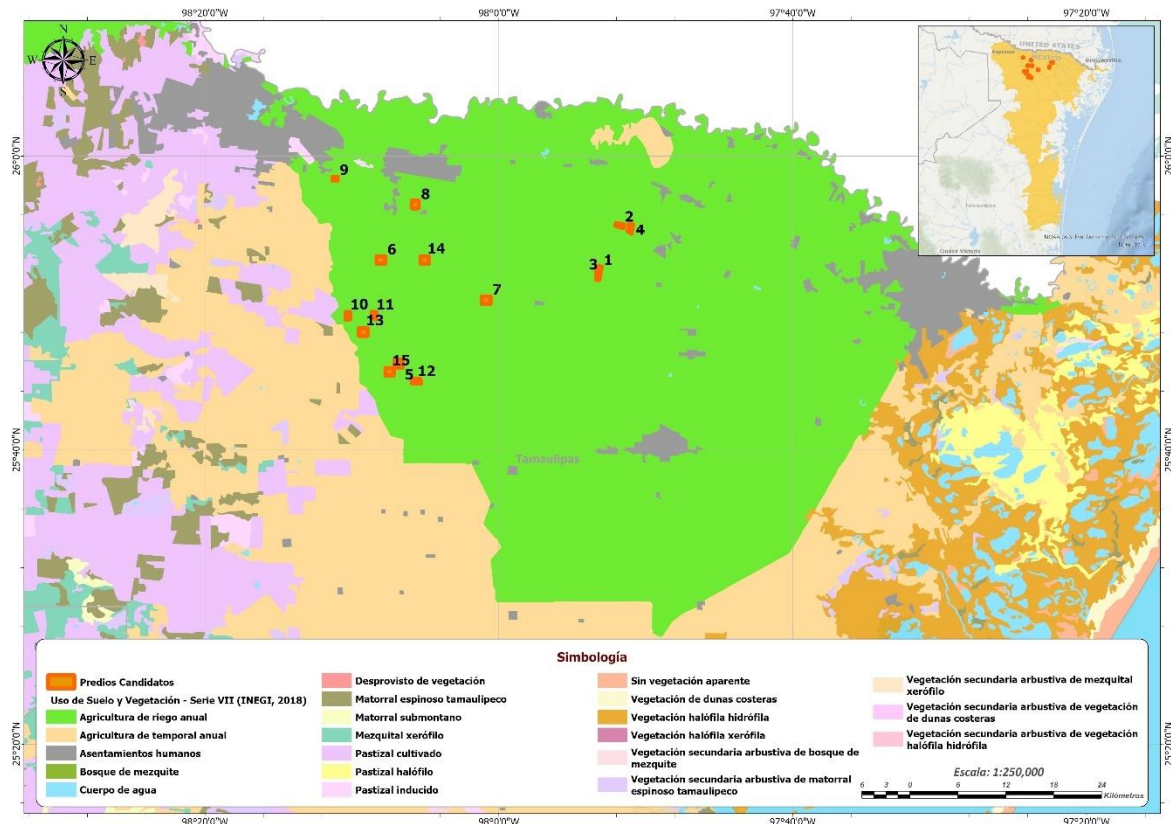


Figura 38. Uso de suelo y cubierta vegetal. Los predios propuestos se ubican dentro de la zona de agricultura de riego de los Municipios de Reynosa, Río Bravo, Valle Hermoso y Matamoros. El uso de suelo urbano o asentamientos humanos dentro de esta zona ocupa aproximadamente el 11% del total de la superficie, siendo las áreas más importantes la ciudad de Río Bravo, Valle Hermoso y Matamoros, y otros numerosos pequeños asentamientos humanos. En los alrededores de la zona se encuentran superficies de agricultura de temporal anual, pastizal cultivado, matorral espinoso tamaulipeco, áreas sin vegetación aparente. Hay presencia de vegetación halófila hidrófila y pastizal halófila en la Laguna Madre y parches aislados de mezquital xerófilo en Reynosa.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

II.c.3. Plano de ubicación señalando vías de comunicación.

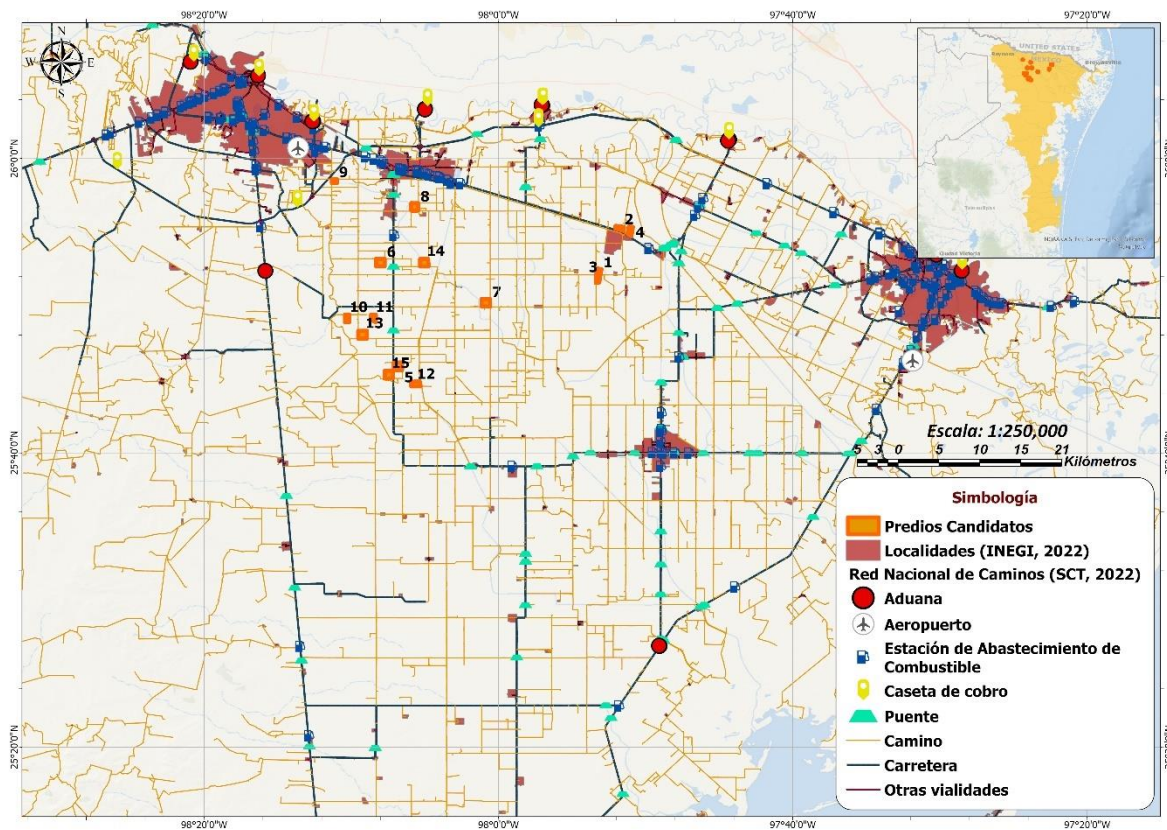


Figura 39. Principales vías de comunicación de la zona donde se localizan los predios candidatos en la ecorregión “Planicie Costera Tamaulipeca”.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

III. IDENTIFICACIÓN DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA.

III.a. Estabilidad de la modificación genética del OGM.

Como se explica en la sección I. **CHARACTERIZACIÓN MOLECULAR**, en el apartado I.s. **Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgén** (Págs. 138-143), Monsanto desarrolló el algodón con eventos apilados a partir de la cruce mendeliana de los eventos individuales MON 88702, MON 15985, COT102, MON 88701 y MON 88913.

La estabilidad genética de cada modificación genética en cada evento individual se evaluó previamente y se observó que sus elementos mostraron estabilidad a través de varias generaciones. Por lo anterior, se concluye que los insertos de ADN en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se integraron de manera estable y las características conferidas son fenotípica y genéticamente estables a través de varias generaciones y condiciones ambientales.

III.b. Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína en diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren.

Se realizó un análisis cuantitativo para evaluar los niveles de las proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, GUS, Vip3Aa19, APH4, DMO, PAT (*bar*) y CP4 EPSPS en tejido de hoja (OSL1 y OSL4), raíz (OSR3), semilla y polen de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y de los eventos individuales que lo componen (MON 88702, MON 15985, COT102, MON 88701 y MON 88913), colectados en cinco localidades durante los ensayos de campo de Estados Unidos de 2016, mediante inmunoensayo multiplex (Tablas 10-19). Los niveles de las proteínas se reportaron en microgramos por gramo en base a peso seco (**ANEXO 15. MSL0028563 Expresión Lygus Stack 2016**).

Los resultados se discutieron previamente en la sección I.i. **Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros**, en la subsección **Expresión** (Ver Págs. 67-79).

III.c. Características del fenotipo del OGM.

El algodón biotecnológico MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 posee una copia del gen *cry51Aa2.834_16*, que codifica para la proteína insecticida mCry51Aa2, que le confiere protección contra el daño por insectos hemípteros (*Lygus lineolaris*, *Lygus hesperus*) y tisanópteros (*Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella fusca*);

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

también una copia de los genes *cry1Ac*, *cry2Ab* y *vip3A(a)*, que codifican las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y Vip3A, respectivamente, que le confieren resistencia a insectos lepidópteros (*Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella*, *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua*); también posee dos copias del gen *cp4 epsps*, una copia del gen *dmo* y una copia del gen *bar*, que codifican las proteínas CP4 EPSPS, DMO y PAT, respectivamente, que le confieren tolerancia a los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato de amonio. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones génicas insertadas en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (heredadas de los eventos individuales) no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

En cuanto a los cambios fenotípicos en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, aparte de la resistencia al ataque de los insectos mencionados y de la tolerancia a los herbicidas, no hay diferencias biológicamente significativas con su contraparte convencional.

III.d. Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente receptor del OGM.

Salvo las características de resistencia a hemípteros, tisanópteros y lepidópteros (genes *cry51Aa2.834_16*, *cry1Ac*, *cry2Ab* y *vip3A(a)*) y tolerancia a los herbicidas glifosato (gen *cp4 epsps*), dicamba (gen *dmo*) y glufosinato de amonio (gen *bar*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones génicas insertadas en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (heredadas de los eventos individuales) no le confieren ninguna característica fenotípica adicional. Este evento de algodón biotecnológico no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional.

Por otro lado, las proteínas citadas no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 con el algodón convencional nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en los mencionados eventos como consecuencia de la modificación genética.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Por todo lo anterior, es posible afirmar que, salvo por la resistencia a los insectos y tolerancia a herbicidas, el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 es fenotípicamente igual que los algodones convencionales tanto en México como en otras regiones del mundo.

III.e. Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto del organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica.

En 2016 se realizó un estudio en Estados Unidos, cuyo propósito fue evaluar las características fenotípicas e interacciones ambientales del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, en comparación con algodón convencional (**ANEXO 17. MSL0029298 Evaluación Fenotípica e Interacciones Stack USA 2016**). Se sembraron ocho localidades con un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones del material de prueba MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, el control convencional y cuatro variedades convencionales de referencia lado a lado.

Se realizó un análisis de sitios combinados con los resultados del material de prueba y el control para ocho características fenotípicas: conteo inicial de plantas, días a floración, conteo final de plantas, altura de plantas, bellotas totales, porcentaje de retención de frutos en primera posición, rendimiento de semilla y peso de semilla. Los rangos observados para las referencias proporcionaron valores de las características fenotípicas representativos de la variabilidad dentro de algodones convencionales para cada característica.

En el análisis de sitios combinados, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el material de prueba y el control convencional para seis de las ocho características evaluadas: conteo inicial de plantas, días a floración, conteo final de plantas, altura de plantas, bellotas totales y rendimiento de semilla (Tabla 21). MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 presentó mayor porcentaje de retención de frutos en primera posición (21.6 vs. 46.0%) y menor peso de semilla (7.3 vs. 8.2 g), en comparación con el control convencional. Sin embargo, el promedio de estos valores para el material de prueba estuvo dentro de la variabilidad del cultivo convencional para estas características (rango de las referencias) (Tabla 21). Por lo anterior, las diferencias no son indicativas de un incremento en el potencial de plaga o maleza en el algodón biotecnológico.

Las características fenotípicas evaluadas en este estudio se utilizaron para caracterizar las plantas de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. No hubo diferencias indicativas de un incremento en el potencial de plaga o maleza del algodón biotecnológico, en comparación con el control convencional. Por lo tanto, no se espera que plantee un riesgo de incrementar el potencial de plaga o maleza, en comparación con el algodón convencional.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 21. Análisis de sitios combinados de las características fenotípicas del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en comparación con el control convencional en las evaluaciones de campo de Estados Unidos en 2016.

Característica	Media (E.E) ¹		Rango de las Referencias ²
	MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913	Control	
Conteo inicial de plantas (plantas/2 surcos)	177.8 (5.11)	178.5 (4.94)	148.5 – 244.6
Días a floración ³	57.1 (0.82)	57.4 (0.98)	50.6 – 64.1
Conteo final de plantas (plantas/2 surcos)	170.7 (5.23)	166.1 (5.15)	144.4 – 230.4
Altura de plantas (cm)	94.7 (4.34)	94.8 (4.57)	80.0 – 166.0
Bellotas totales (Bellotas/planta)	10.0 (0.50)	9.8 (0.57)	3.7 – 11.8
Retención de frutos en primera posición (%)	51.6 (3.60) *	46.0 (3.16)	10.4 – 61.0
Rendimiento de semilla (kg/ha)	3,486.2 (221.82)	3,526.5 (210.91)	1,142.5 – 4,460.5
Peso de semilla (g)	7.3 (0.10) *	8.2 (0.15)	6.4 – 10.2

* Indica diferencia estadísticamente significativa entre el material de prueba y control convencional ($\alpha=0.05$) utilizando ANOVA.¹ N=32 para la media del material y prueba, excepto para la variable días a floración en una localidad (GACH, Tift County, Georgia). E.E. = Error estándar.² Valores promedio mínimo y máximo entre las referencias, donde cada media se combinó entre todas las localidades donde se sembraron las referencias.³ Días después de la siembra.

Salvo las características de resistencia al ataque de insectos hemípteros, tisanópteros y lepidópteros y de tolerancia a los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato de amonio, ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, incluyendo cambios en el ciclo biológico o la morfología básica. Este evento de algodón biotecnológico no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional.

III.f. Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM.**Evento MON 88702 (Propiedad de Monsanto).**

En 2015 y 2016 se realizaron estudios en Estados Unidos, cuyo propósito fue evaluar la abundancia de organismos no blanco (ONB) en el algodón MON 88702, en comparación con el algodón convencional. Con la información de ambos años se realizó una evaluación comparativa de la abundancia de ONB entre MON 88702 y el control convencional bajo diversas condiciones geográficas y ambientales a través de dos años (**ANEXO 18. MSL0029195 Abundancia de NTOs MON 88702 USA 2015 y 2016**). Los estudios se realizaron en seis localidades cada año, distribuidas en la zona algodонера de Estados Unidos,

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

incluyendo los estados de Texas, Mississippi, Georgia, Louisiana, North Carolina y South Carolina. Las localidades en Texas, Mississippi, Louisiana y North Carolina se traslaparon los dos años.

En cada sitio se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, donde se sembró el algodón MON 88702, el control convencional, y cuatro variedades convencionales comerciales como referencias. Las referencias proporcionaron un rango de valores comunes al algodón comercial para las características evaluadas.

Los organismos se colectaron utilizando láminas de golpeo. Las colectas se realizaron seis veces durante la temporada, empezando en la etapa de cuadro temprano y hasta dos semanas después, finalizando en con la última colecta después del “Cut-out”.

La identificación taxonómica se realizó en el laboratorio de Monsanto (2015) y en la Universidad de Arkansas (2016). Los artrópodos identificados se agruparon por familia para asegurar que se evaluaran las funciones ecológicas relevantes. Para asegurar un análisis válido del efecto del material sobre la abundancia de ONB, las localidades fueron excluidas si la media por parcela por colecta fue menor a uno (Ahmad *et al.*, 2016).

En el análisis entre años, no se detectaron diferencias significativas para 15 de los 16 *taxa* evaluados (Tabla 22). La abundancia de catarinas fue significativamente mayor en MON 88702 que en el control convencional ($P=0.027$). Esta diferencia fue impulsada por la diferencia significativa observada en 2015 para este taxón (1,520 vs. 1,150 individuos).

En el análisis de poder estadístico entre años, todos los *taxa*, excepto tres, tuvieron $\geq 80\%$ de poder para detectar una diferencia de 50% entre la abundancia de MON 88702 y el control convencional (Tabla 22). Se ha encontrado que una diferencia del 50% en abundancia de organismos entre tratamientos es ecológica y biológicamente relevante en evaluaciones de campo (Perry *et al.*, 2003; Naranjo, 2005; Duan *et al.*, 2006) al 5% de error Tipo I. Los *taxa* con suficiente poder abarcaron las funciones clave ecológicamente relevantes de herbivoría, depredación y parasitismo, incluyendo las familias de hemípteros Aphididae, Geocoridae, Nabidae; Anthocoridae, Pentatomidae y Aleyrodidae. Otros *taxa* con más de 80% de poder estadístico pertenecen a los órdenes Coleoptera, Araneae, Neuroptera e Hymenoptera. La falta de diferencias en estos análisis es evidencia adicional de que es poco probable que MON 88702 plantee un riesgo de incrementar el potencial de plaga o que tenga efectos adversos sobre comunidades de artrópodos relevantes en ecosistemas agrícolas de producción de algodón.

Los resultados través de dos años demuestran la ausencia de efectos adversos a comunidades de artrópodos que representan las funciones ecológicas de herbívoros, depredadores y parasitoides en el agroecosistema tras la exposición significativa en campo al algodón MON 88702.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

La falta de diferencias significativas en la abundancia de ONB también apoya la conclusión de que no se espera que la introducción de que la característica de protección contra insectos hemípteros y tisanópteros del evento MON 88702, introducido en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 resulte en un incremento del potencial de plaga o maleza, en comparación con el algodón convencional.

Tabla 22. Medias y error estándar (E.E.) de la abundancia de artrópodos entre los años 2015 y 2016 colectados con lámina de golpeo en el algodón MON 88702, en comparación con el control convencional.

Artrópodo ¹	Número de sitios ²	MON 88702	Control	Poder Estadístico (%) ³
Anticídidos (Coleoptera: Anthicidae)	9	2.9 (0.23)	2.4 (0.26)	88.2
Hormigas (Hymenoptera: Formicidae)	11	7.2 (1.04)	6.6 (0.88)	94.2
Áfidos (Hemiptera: Aphididae)	9	20.7 (4.62)	19.5 (4.30)	89.5
Chinches asesinas (Hemiptera: Reduviidae)	2	4.1 (1.18)	3.8 (0.67)	46.8
Geocóridos (Hemiptera: Geocoridae)	10	9.3 (1.73)	10.2 (1.79)	97.7
Elatéridos (Coleoptera: Elateridae)	2	1.8 (0.41)	2.3 (0.33)	53.2
Nábidos (Hemiptera: Nabidae)	5	1.9 (0.27)	2.8 (0.45)	89.8
Heliotinos (Lepidoptera: Noctuidae)	3	2.5 (0.28)	2.2 (0.24)	81.3
Crisópidos (Neuróptera: Chrysopidae)	8	1.9 (0.20)	2.1 (0.24)	99.5
Catarinas (Coleoptera: Coccinellidae)	10	7.6 (1.15) *	6.2 (0.91)	100.0
Cicadélicos (Hemiptera: Cicadellidae)	4	3.1 (0.43)	2.6 (0.32)	75.1
Antocóridos (Hemiptera: Anthocoridae)	12	5.4 (0.42)	5.3 (0.48)	100.0
Avispas Parasíticas (Hymenoptera)	8	5.1 (0.94)	5.6 (1.13)	98.6
Arañas (Araneae)	12	10.4 (0.88)	10.3 (0.91)	100.0
Pentatómidos (Hemiptera: Pentatomidae)	4	3.3 (0.56)	4.5 (0.95)	97.5
Mosquitas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae)	5	108.1 (42.74)	129.1 (52.98)	87.3

* Indica diferencias estadísticamente significativas entre MON 88702 y el control convencional ($\alpha = 0.05$).

Nota: El diseño experimental fue de bloques completos al azar (RCBD) con cuatro repeticiones.

¹ Los artrópodos se colectaron seis veces en cada sitio empezando en cuadro temprano, y después cada 15 días.

² Número de sitios donde cada taxón ocurrió, combinados de ambos años.

³ Poder estadístico para detectar un cambio en la abundancia de artrópodos del 50% entre MON 88702 y el control convencional, dado un RCBD y $\alpha = 0.05$.

Evento COT102 (Propiedad de Syngenta y Licenciado a Monsanto).

Para información más detallada consultar la información de abundancia de artrópodos del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Evento Bollgard®II (MON 15985) (Propiedad de Monsanto).

Los algodones Bollgard® (MON 531) y Bollgard®II (MON 15985) se desarrollaron para proveer protección contra insectos lepidópteros plaga. El primero se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante que produce la proteína Cry1Ac. El segundo fue la retransformación de Bollgard® con la secuencia codificante que produce la proteína Cry2Ab.

En 1999 se realizaron evaluaciones en Estados Unidos para comparar la abundancia de organismos no blanco (ONB) en los algodones Bollgard® y Bollgard®II con el algodón convencional. Los estudios se realizaron en dos localidades distribuidas en la zona algodонера, en los estados de Mississippi (sitio MS) y Arizona (sitio AZ) (**ANEXO 19. MSL18967 Abundancia de NTOs MON 531 y MON 15985 USA 1999**). En ambas localidades se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La abundancia de artrópodos se evaluó a través de la temporada utilizando trampas de caída y red.

Los artrópodos colectados, identificados y enumerados incluyeron plagas del algodón, depredadores, herbívoros y organismos del follaje y del suelo. Se colectaron más de 24,000 individuos representando 21 órdenes y más de 140 familias, incluyendo insectos plaga (Miridae, Noctuidae y Lygaeidae), enemigos naturales (Coccinellidae, Carabidae, Staphylinidae, Neuroptera y avispa parasíticas de varias familias) y otros grupos como detritívoros y descomponedores (Formicidae, Collembola y Anthicidae).

En la localidad MS no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas que incluyeron 7 familias de artrópodos colectados con trampas de caída y 13 familias colectadas con red.

En la localidad AZ, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en 13 de las 14 familias de artrópodos colectados con trampas de caída. Se detectaron diferencias significativas entre Bollgard® y Bollgard®II y el control para hormigas (Formicidae) y Entomobryidae (Collembola). Los resultados de las comparaciones mostraron un mayor número de hormigas en el control que en Bollgard®II (2.3 vs. 0.2 individuos); y mayor número de Collembola en el algodón convencional que en los algodones Bollgard® y Bollgard®II (6.4.2 vs. 28.9 vs. 21.3 individuos, respectivamente). Al respecto, en el predio MS no se detectaron diferencias en la abundancia de Collembola entre los tres materiales, por lo que no es probable que la diferencia observada en el predio AZ se deba a las características biotecnológicas introducidas. Las hormigas no fueron lo suficientemente abundantes en el predio MS para realizar la comparación entre materiales. Se conoce que las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab son altamente específicas en su modo de acción para lepidópteros y no para miembros del Orden Hymenoptera al que pertenecen las hormigas (Schnepf *et al.*, 1998). Esto sugiere que no es probable que la diferencia en abundancia de hormigas observada en AZ se deba a las características biotecnológicas introducidas.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

En AZ, se detectó una sola diferencia en las familias colectadas con red en cuanto a la abundancia de nitidúlidos (Nitidulidae), que fueron más abundantes en el control convencional que en Bollgard® y Bollgard®II (26.2 vs. 13.2 vs. 11.1 individuos, respectivamente). Los nitidúlidos no fueron suficientemente abundantes en el predio MS para realizar la comparación entre materiales. Sin embargo, es improbable que la diferencia en abundancia de nitidúlidos en AZ resultara de toxicidad directa de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab porque éstas no tienen actividad insecticida contra coleópteros (Palmer y Krueger, 2000; Bravo, 1997, Palmer y Beavers, 1993).

En general, estos resultados indican que la presencia de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab en los algodones Bollgard® o Bollgard®II no afectó la abundancia de ONB asociados al algodón.

Inocuidad de las proteínas CP4EPSPS, DMO y PAT.

CP4 EPSPS.

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizósfera de las plantas. Únicamente el gen *cp4 epsps* de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes al herbicida Faena®. La secuencia del ADN transferido y de la proteína CP4 EPSPS producida es completamente conocida y se encuentra presente en todas las plantas y en la mayoría de los microorganismos que comúnmente son parte de nuestra dieta, y no existe evidencia de que esta proteína pueda causar algún efecto negativo en la salud humana o de cualquier otro vertebrado. Adicionalmente, no se espera que los humanos estén expuestos a la proteína CP4 EPSPS expresada por el algodón biotecnológico, ya que el aceite derivado del algodón utilizado para el consumo humano no contiene esta proteína.

La proteína CP4 EPSPS contenida en MON 88913 es similar a la proteína EPSPS nativa que es ubicua en plantas y microorganismos en el ambiente. Por lo tanto, basados en esta historia de ocurrencia, no se espera que la proteína EPSPS posea actividad biológica hacia organismos no plaga. Aunque la probabilidad de peligro es baja para la proteína CP4 EPSPS, varios investigadores han realizado estudios de laboratorio con diferentes tipos de artrópodos expuestos a cultivos tolerantes a glifosato, conteniendo la proteína CP4 EPSPS (Goldstein, 2003; Boongird *et al.*, 2003; Jamornman *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2003). Se expusieron polinizadores representativos, organismos del suelo, artrópodos benéficos y especies de plagas a tejidos (polen, semilla y follaje) de cultivos tolerantes a glifosato, que contenían la proteína CP4 EPSPS. Todos estos estudios, aunque variaron en su diseño, reportaron una ausencia de toxicidad en varias especies expuestas a cultivos tolerantes a glifosato que producían la proteína CP4 EPSPS (Nahas *et al.*, 2001; Dunfield y Germida, 2003; Siciliano y Germida, 1999).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

La ausencia de toxicidad es además apoyada por experimentos de campo realizados con cultivos biotecnológicos que producían la proteína CP4 EPSPS. La diversidad y abundancia de colémbolos no fue diferente entre soya tolerante a glifosato y soya convencional cultivadas bajo el mismo sistema de manejo (Bitzer *et al.*, 2002). Otros estudios con soya tolerante a glifosato bajo varios sistemas de manejo de maleza concluyeron que no había un efecto directo aparente de la característica de tolerancia a glifosato sobre los artrópodos, aunque el manejo de malezas y las diferencias fenotípicas como altura de planta o madurez asociadas con la variabilidad en las plantas influenciaron las poblaciones de artrópodos (Jasinski *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2003; Buckelew *et al.*, 2000). Por lo anterior, no hay razón para anticipar que la proteína CP4 EPSPS en MON 88913 impacte organismos no blanco, en comparación con el algodón convencional.

La proteína CP4 EPSPS no presenta homología con las secuencias de aminoácidos de las proteínas tóxicas y alergénicas de las bases de datos Pir Protein, Swissprot (Bairoch y Boeckmann, 1993) y Genpept (Benson *et al.*, 1993). La secuencia de aminoácidos o regiones de alta homología entre dos o más proteínas puede proveer información importante sobre la actividad biológica de una proteína. Es decir, la secuencia de aminoácidos puede proveer información acerca de las propiedades estructurales, hidrofóbicas e hidrofílicas, inmunogenicidad, estabilidad y la posible función de la proteína identificada. El uso de bases de datos ha demostrado ser una excelente herramienta para predecir la función biológica de proteínas desconocidas. La secuencia de la proteína CP4 EPSPS fue comparada con las secuencias peptídicas identificadas como “alérgenos” y “toxinas” de todas las bases de proteínas disponibles para identificar si tiene alguna homología con alérgenos o toxinas. Los resultados muestran que no existe ninguna homología significativa entre las secuencias de los alérgenos y toxinas conocidas y la secuencia de la proteína CP4 EPSPS.

DMO.

La DMO es una enzima que cataliza la demetilación del dicamba al compuesto no-herbicida DCSA y formaldehído (Chakraborty *et al.*, 2005). DMO es homóloga a proteínas que son comunes en el ambiente y en las dietas de animales y humanos. Dada la amplia exposición de los humanos y animales a estas proteínas oxigenasas homólogas, se puede concluir que las oxigenasas tienen un historial de uso seguro.

Cuando se determina la homología entre proteínas, se deben tener en cuenta tanto la secuencia lineal de aminoácidos como la estructura de orden más alto. Las estructuras de orden alto son una medida relevante de la homología ya que la estructura es más conservada que la secuencia de aminoácidos. Los cambios en las secuencias de aminoácidos son, evolutivamente, más conservadores, lo que significa que los cambios en éstos no afectan la estructura, la cual a su vez determina la función (Caetano-Anollés *et al.*, 2009; Illergård *et al.*, 2009). Esta conservación de la estructura es predominante en dominios de importancia

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

funcional y estructural de proteínas en clases similares (Illergård *et al.*, 2009). Por lo tanto, es necesario entender los diferentes niveles de la estructura de las proteínas para evaluar apropiadamente la homología y determinar si las proteínas homólogas de la DMO expresada en el evento MON 88701 se distribuyen ampliamente en la naturaleza o están presentes en fuentes consumidas por animales y el ser humano.

Como se describió previamente, la DMO está clasificada en el grupo de las oxigenasas, que son enzimas que incorporan uno o dos átomos de oxígeno a los sustratos, y se distribuyen extensamente en muchas rutas metabólicas universales (Harayama *et al.*, 1992). Dentro de esta amplia clase enzimática se encuentran las monooxigenasas que incorporan un solo átomo de oxígeno como un grupo hidroxilo con la concomitante producción de agua y oxidación del NADH (Harayama *et al.*, 1992). Las oxigenasas de hierro de tipo no-hemo, donde el hierro está involucrado en el sitio catalítico, son una importante clase de oxigenasas. Dentro de esta clase se encuentran las Rieske oxigenasas de hierro no-hemo, que contienen un centro Rieske hierro-azufre [2Fe-2S]. Todas las Rieske oxigenasas de hierro no-hemo contienen dos dominios catalíticos, un dominio de hierro no-hemo (nh-Fe) que es un sitio de activación de oxígeno, y un dominio Rieske [2Fe-2S] que funciona transportando electrones desde la ferredoxina al dominio de hierro no-hemo (Ferraro *et al.*, 2005). La proteína DMO pertenece a esta clase de oxigenasas que se encuentran en *phylum* diversos desde bacterias a plantas consumidas por humanos y animales (Ferraro *et al.*, 2005; Schmidt y Shaw, 2001).

Los resultados de cristalografía demostraron que la estructura cuaternaria de la proteína DMO es un trímero, donde cada monómero se encuentra en una orientación precisa que permite el transporte de electrones entre dos dominios conservados; los dominios Rieske y el hierro no-hemo. De manera similar a todas las Rieske oxigenasas de hierro no-hemo, los monómeros de DMO contienen estos dos dominios catalíticos importantes y altamente conservados (D'Ordine *et al.*, 2009; Dumitru *et al.*, 2009; Ferraro *et al.*, 2005). La estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de estos dominios está altamente conservada, lo que conduce a dominios de estructura secundaria y terciaria que tienen la orientación espacial correcta de los dominios de hierro no-hemo y Rieske [2Fe-2S] en los monómeros de DMO para asegurar el transporte de electrones desde la ferredoxina y entre los monómeros de DMO (D'Ordine *et al.*, 2009; Ferraro *et al.*, 2005).

Los dominios Rieske son ubicuos en numerosas proteínas de bacterias y plantas como la proteína hierro-azufre del complejo *b_{c1}* del citocromo, el complejo *b6-f* del citocromo del cloroplasto de espinaca, y las colina monooxigenasas (Breyton, 2000; Darrouzet *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2004; Hibino *et al.*, 2002; Rathinasabapathi *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1998). La presencia de dos dominios conservados, el dominio Rieske [2Fe-2S] y el hierro no-hemo, sugiere que todas las Rieske oxigenasas de hierro no-hemo comparten el mismo mecanismo de reacción, por el cual el dominio Rieske transfiere electrones desde la ferredoxina al dominio hierro no-hemo para permitir la catálisis (Chakraborty *et al.*, 2005; Dumitru *et al.*, 2009; Ferraro

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

et al., 2005). La conservación de estos importantes dominios estructurales requeridos para la actividad enzimática es aún más evidencia de la relación evolutiva de todas las Rieske oxigenasas de hierro no-hemo (Nam *et al.*, 2001; Rosche *et al.*, 1997; Werlen *et al.*, 1996). Por lo tanto, se han descrito enzimas con homología estructural y funcional a la DMO expresada en el evento MON 88701 en plantas y bacterias y se han consumido ampliamente.

Adicionalmente, se realizaron búsquedas mediante alineación de secuencias en formato FASTA en bases de datos públicas usando la secuencia de proteínas de la DMO expresada por el evento MON 88701 y se obtuvieron secuencias homólogas de diferentes especies, predominantemente bacterias, con identidad en la secuencia de aminoácidos de hasta 42%. Los alineamientos de la DMO con proteínas de plantas revelaron oxigenasas homólogas presentes en plantas cultivadas, como canola (*Brassica napus*), maíz (*Zea mays*), chícharo (*Pisum sativum*), arroz (*Oryza sativa*) y soya (*Glycine max*), que se determinó tienen identidades de secuencia de hasta aproximadamente 27% (Tabla 23). La homología más alta se encontró en proteínas involucradas en el metabolismo de la clorofila. La clorofilida A oxigenasa (Número de acceso: ACG42449) es una oxigenasa tipo Rieske que se requiere para la formación de la clorofila b, presente en todas las plantas (Tanaka *et al.*, 1998). La feoforbida A oxigenasa (Número de acceso: ABD60316) también es una oxigenasa tipo Rieske que juega un papel clave en la regulación general de la degradación de la clorofila en plantas (Rodoni *et al.*, 1997). La feoforbida A oxigenasa está presente constitutivamente en todos los tejidos verdes y, en niveles un poco más bajos, en tejidos etiolados y no fotosintéticos incluyendo semillas (Yang *et al.*, 2004). Como una oxigenasa tipo Rieske, se espera que la feoforbida A oxigenasa tenga un alto grado de homología estructural secundaria y terciaria a elementos estructurales similares en la proteína DMO como se describe arriba. La presencia de estos dominios estructurales conservados en estas proteínas vegetales es más evidencia de que ha ocurrido exposición a homólogos estructurales de la proteína DMO a través del consumo de los cultivos mencionados.

Por lo tanto, la proteína DMO comparte homología en todos los niveles de estructura proteica (p.e. primaria, secundaria, terciaria) con una amplia variedad de oxigenasas presentes en bacterias y plantas prevalentes en el ambiente y consumidas, lo que establece que los animales y humanos están ampliamente expuestos a estos homólogos estructurales sin reportes de efectos adversos debidos a la proteína.

La proteína PAT expresada en el evento MON 88701 es idéntica a la proteína nativa producida en la bacteria *S. hygroscopicus* y es análoga a las proteínas PAT en productos tolerantes a glufosinato de varios cultivos disponibles comercialmente como algodón, maíz, soya y canola. Basados en estudios que caracterizaron la cinética y mecanismos químicos de las proteínas PAT (Wehrmann *et al.*, 1996), la OECD reconoce que las proteínas PAT producidas de diferentes genes como equivalentes en relación con función y seguridad (OECD, 1999).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Tabla 23. Identidad en la secuencia de aminoácidos entre la proteína DMO expresada en el evento MON 88701 y otras proteínas presentes en plantas.

Proteína	Número de Acceso ¹	Nombre Científico	Nombre Común	Identidad de Secuencia (%) ²
Clorofilida A oxigenasa	ACG42449	<i>Zea mays</i>	Maíz	27.3
Feofórbida A oxigenasa	ABD60316	<i>Brassica napus</i>	Canola/Colza	26.0
Proteína letal como la mancha de hoja-1*	ABA40832	<i>Glycine max</i>	Soya	25.7
Proteína Rieske hierro-azufre Tic55	CAA04157	<i>Pisum sativum</i>	Chícharo	25.4
Feofórbida A oxigenasa	CAR82238	<i>Pisum sativum</i>	Chícharo	24.6
Feofórbida A oxigenasa	ACG28057	<i>Zea mays</i>	Maíz	24.3
Proteína conteniendo dominio Rieske	ABF99438	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	23.7
Flavonoide-3-hidroxilasa	AAV74195	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	21.1
Inflorescencia dispersa 1	ACI43576	<i>Zea mays</i>	Maíz	17.8
Colina mono-oxigenasa	AAB52509	<i>Spinacia oleracea</i>	Espinaca	17.6
Beta-caroteno hidroxilasa	AAX45523	<i>Zea mays</i>	Maíz	15.8
Proteína conteniendo dominio Rieske	ACG43734	<i>Zea mays</i>	Maíz	14.5
Colina mono-oxigenasa	CAE17617	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	12.6

*Identificada después como Feofórbida A Oxigenasa (Yang *et al.*, 2004). ¹Los números de acceso mostrados son de la base de datos de GenBank. ²Las secuencias de proteína se tomaron de bases de datos públicas. Cada secuencia fue alienada con la proteína DMO expresada en el evento **DGT** mediante el método Clustal W y la identidad de la secuencia se calculó utilizando la función MegAlign del programa Lasergene (software de análisis de secuencias, versión 8.0.2) de DNASTAR, Inc. Madison, Wisconsin).

Se ha evaluado ampliamente la seguridad de la proteína PAT presente en cultivos derivados de biotecnología (ILSI-CERA, 2011) y en 1997 se extendió una exención de tolerancia para las proteínas PAT por la EPA (1997). Esta exención se basó en la evaluación de riesgo que incluyó digestión rápida en fluidos gástricos simulados, falta de homología significativa a toxinas y alérgenos conocidos, y falta de toxicidad un estudio de alimentación aguda oral. Se han revisado muchos productos tolerantes a glufosinato incluyendo aquellos en algodón, maíz, soya, canola, remolacha y arroz por la FDA (U.S. FDA, 1995a; 1995b; 1995c; 1997; 1998a; 1998b; 1999; 2002) sin identificar preocupaciones. Más aún un estudio exhaustivo sobre la seguridad de las proteínas PAT presentes en cultivares derivados de la biotecnología (Hérouet *et al.*, 2005) demostró que poseen similitud estructural con otras acetiltransferasas conocidas por no causar efectos adversos tras su consumo, falta de homología de secuencia con alérgenos y toxinas conocidas, falta de sitios de glicosilación, degradación rápida en fluidos gástricos e intestinales y ausencia de efectos en ratones tratados con altas dosis de proteínas PAT. Hérouet *et al.* (2005) concluyeron que hay certeza razonable de no presentarse daño resultante de la inclusión de las proteínas PAT en alimento humano o animal.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El historial de uso seguro de la proteína PAT está apoyado por la falta de reportes documentados de efectos adversos relacionados con esta proteína desde la introducción de cultivos tolerantes a glufosinato en 1995 (Duke y Powles, 2009). Desde entonces, se han emitido aprobaciones, por parte de agencias regulatorias de 11 países, para la liberación al ambiente de más de 38 eventos de transformación incluyendo 8 diferentes especies de plantas que expresan la proteína PAT (ILSI-CERA, 2011).

Las consecuencias medioambientales de la introducción del evento de algodón MON 88701 han sido consideradas y no existe razón para creer que tenga un impacto negativo en organismos no blanco.

III.g. Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad.

A continuación, se enlistan los métodos de detección para el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, los cuales se presentan en formato electrónico como parte de esta solicitud (**Ver Carpeta Métodos de detección**).

Protocolos:

Monsanto Company. A recommended procedure for DNA extraction from plant tissues. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (**ANEXO 20. Extracción de ADN vegetal**).

Monsanto Company. A Recommended procedure for PEG precipitation of genomic plant DNA. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (**ANEXO 21. Precipitación PEG ADN genómico**).

Monsanto Company. A recommended procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for, MON 88702. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (**ANEXO 22. PCR MON 88702**).

Monsanto Company. A recommended procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Bollgard II® cotton, MON 15985. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (**ANEXO 23. PCR MON 15985**).

Monsanto Company. A recommended procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Roundup Ready® Flex cotton, MON 88913. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (**ANEXO 24. PCR MON 88913**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Monsanto Company. A recommended procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for DGT® cotton, MON 88701. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (**ANEXO 25. PCR MON 88701**).

Para información detallada sobre el método de detección del evento COT102, consultar la información de caracterización molecular del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

III.h. Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas.

Potencial de flujo génico mediado por polen e introgresión.

El flujo de genes mediado por polen (a menudo nombrada polinización cruzada) ocurre cuando polen de una planta fertiliza óvulos de una segunda planta sexualmente compatible. El flujo de genes mediado por polen es afectado por factores bióticos y abióticos como la biología de la planta, biología y volumen del polen, fenología de la planta, coincidencia de la floración, proximidad de la fuente de polen y las plantas receptoras, condiciones ambientales como temperatura y humedad, y arquitectura del campo. El flujo de genes mediado por polen es un proceso biológico natural y, por lo tanto, no constituye un riesgo ambiental por sí mismo.

La introgresión es un proceso donde uno o más genes se incorporan exitosamente al genoma de la planta receptora. El flujo de genes mediado por polen y la introgresión deben considerarse en el contexto de los transgenes insertados en la planta biotecnológica, y la probabilidad de que la presencia de los transgenes y su subsecuente transferencia a las plantas receptoras y poblaciones de plantas resulte en un potencial de plaga/maleza incrementado.

Hibridación con algodón cultivado.

Aunque el cruzamiento natural es posible, el algodón es normalmente considerado un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984). Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. El polen se puede transferir por insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas mieleras (Van Deynze *et al.*, 2005). La literatura sobre el algodón muestra que la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen. McGregor (1976) rastreó el movimiento de polen por medio de marcaje con partículas fluorescentes y encontró que, incluso entre flores localizadas a 150-200 pies de un campo de algodón rodeado de numerosas colonias de abejas para asegurar una buena oportunidad de transferencia de polen, las partículas se detectaron sólo en 1.6% de las

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

flores. En un estudio con varios diseños de campo, Llewellyn y Fitt (1996) también encontraron bajos niveles de polinización cruzada en algodón. A un metro de la fuente de polen observaron frecuencias de polinización cruzada de 0.15 a 0.4%, disminuyendo por debajo de 0.3% a los 16 metros de la fuente. Umbeck et al. (1991) encontraron que la polinización cruzada decrecía de 5 a menos del 1% de uno a siete metros, respectivamente, de la fuente de polen. Se detectó un nivel muy bajo de polinización (menos del 1%) esporádicamente a la distancia más larga (25 m). Berkey et al. (2002) reportaron que la polinización cruzada entre campos separados por un camino de 4 metros disminuyó de 1.89% en el surco más cercano a la fuente hasta 0% en el surco 24.

El potencial para polinización cruzada e introgresión desde el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 a algodón cultivado es bajo dado que el movimiento del polen de algodón por el viento es limitado por su tamaño grande y ser pegajoso, y varios estudios han demostrado que la polinización cruzada está limitada por la distancia. Por lo anterior, la transferencia de polen de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 a otros algodones se considera insignificante.

Hibridación con otras especies del género *Gossypium*.

Como se explica en la sección **I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**, en el apartado **I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles** (Págs. 49-53), de las 50 especies reportadas del género *Gossypium* (5 tetraploides y 45 diploides), solo cuatro son sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*G. hirsutum*), que conforma la quinta especie. Los híbridos obtenidos entre el algodón cultivado, *Gossypium hirsutum* (tetraploide), y las especies diploides del género *Gossypium* son raros y, cuando estos ocurren, los híbridos resultantes son estériles. De las cuatro especies tetraploides compatibles, tres están geográficamente aisladas de México (*G. darwinii*, *G. mustelinum* y *G. tomentosum*) y de la producción comercial de algodón y, por esta razón, es altamente improbable que se crucen con *G. hirsutum*. La hibridación entre *G. hirsutum* y *G. barbadense* está limitada por barreras biológicas (diferencias estructurales de cromosomas que causan la eliminación de genes del progenitor y combinaciones de genes que pueden resultar letales). Entonces, el flujo génico desde *G. hirsutum* a las cuatro especies tetraploides relacionadas es limitada y se considera insignificante.

Se realizó una búsqueda en la base de datos de CONABIO (SEMARNAT) para identificar las especies reproductivamente compatibles con el algodón tetraploide MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (*G. hirsutum*) en la ecorregión *Planicie Costera Tamaulipeca* (Tamaulipas Norte), mediante sistemas de información geográfica. Los resultados de esta búsqueda fueron que:

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Se encontraron seis colectas de la especie *G. hirsutum* (tetraploide) en la base de datos de CONABIO (US National Plant Germplasm System). Una colecta se localizó en la localidad de Ladrillera, Municipio de San Fernando, a una distancia de más de 100 Km al predio candidato más cercano (Tamaulipas 5) propuesto para las evaluaciones experimentales de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Las colectas restantes se localizaron en las cercanías de la Laguna Madre al norte del Municipio Soto La Marina, a una distancia aproximada de 165 Km al predio candidato más cercano (Tamaulipas 5) (Figura 15).

Finalmente, todas las especies conocidas de *Gossypium* diferentes a las tetraploides poseen el mismo número de cromosomas ($n=13$). No se ha generado en la naturaleza otra ploidía en este género que haya sobrevivido hasta nuestros días. Esto es particularmente importante para México debido a que las especies tetraploides y diploides han coexistido por más de un millón de años (Wendel, 1989) y no se tienen registro de especies hexaploides, lo cual apoya la baja probabilidad de entrecruzamiento del algodón cultivado con sus parientes silvestres.

III.i. Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.

Ahmad, A., Negri, I., Oliveira, W., Brown, C., Asiimwe, P., Sammons, B. Horak, M., Jiang, C., and Carson, D. 2016. Transportable data from non-target arthropod field studies for the environmental risk assessment of genetically modified maize expressing an insecticidal double-stranded RNA. *Transgenic Research* 25:1-17.

Bairoch, A., and Boeckmann, B. 1993. The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments. *Nucleic Acids Research* Jul 1;21(13):3093-6.

Benson, D., D. J. Lipman, and J. Ostell. 1993. "GenBank". *Nucl. Acids Res.* 21:2963-2965.

Bitzer, R.J., L.D. Buckelew, and L.P. Pedigo. 2002. Effects of transgenic herbicide-tolerant soybean varieties and systems of surface-active springtails (Entomognatha: Collembola). *Env. Ent.* 31:449-461.

Boongird, S., T. Seawannasri, T. Ananachaiyong, and S. Rattithumkul. 2003. Effect of Roundup Ready corn NK603 on foraging behavior and colony development of *Apis mellifera* L. under greenhouse conditions. Pp 26-27. *Proceeding of the Sixth National Plant Protection Conference*, November 24-27, 2003.

Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationship of *Bacillus thuringiensis* 6-endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of Bacteriology*, 179: 2793-280 1.

Breyton, C. 2000. The cytochrome b6f complex: Structural studies and comparison with the bc1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1459:467-474.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Buckelew, L.D., L.P. Pedigo, H.M. Mero, M.D.K. Owen, and G.L. Tylka. 2000. Effects of weed management systems on canopy insects in herbicide-resistant soybeans. *J. Econ. Ent.* 93:1437-1443.
- Caetano-Anollés, G., M. Wang, D. Caetano-Anollés and J.E. Mittenthal. 2009. The origin, evolution and structure of the protein world. *Biochemical Journal* 417:621-637.
- Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba α -demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437:20-28.
- Darrouzet, E., J.W. Cooley and F. Daldal. 2004. The cytochrome *bc1* complex and its homologue the *b₆f* complex: Similarities and differences. *Photosynthesis Research* 79:25-44.
- D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392:481-497.
- Duan, J.J., Jiang, C., Head, G.P., Bhatti, M.A. *et al.* (2006) Statistical power analysis of a 2-year field study and design of experiments to evaluate non-target effects of genetically modified *Bacillus thuringiensis* corn. *Ecological Entomology*, **31**, 521–531.
- Duke, S.O. and S.B. Powles. 2009. Glyphosate-resistant crops and weeds: Now and in the future. *AgBioForum* 12:346-357.
- Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392:498-510.
- Dunfield, K.E., and J.J. Germida. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7310-7318.
- EPA. 1997. Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants; Exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. *Federal Register* 62:17717-17720.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- FDA. 1995a. AgrEvo BNF No. 23: Oilseed rape: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. HCN92. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=8> [Accessed April 2, 2012].
- FDA. 1995b. Dekalb Genetics BNF No. 28: Corn: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. DLL25. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=16> [Accessed April 2, 2012].
- FDA. 1995c. AgrEvo BNF No. 29: Corn: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. T14, T25. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=15> [Accessed April 2, 2012].
- FDA. 1997. AgrEvo BNF No. 46: Canola: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. T45. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=30> [Accessed April 2, 2012].
- FDA. 1998a. AgrEvo BNF No. 55: Soybean: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. A2704-12, A5547-127. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=38> [Accessed April 2, 2012].
- FDA. 1998b. AgrEvo BNF No. 38: Sugar beet: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. T120-7. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=43> [Accessed April 2, 2012].
- FDA. 1999. Aventis BNF No. 63: Rice: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. LLRICE E06, LLRICE E62. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=50> [Accessed April 2, 2012].
- FDA. 2002. Bayer CropScience BNF No. 86: Cotton: Tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. LLCotton25. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=bioListing&id=56> [Accessed April 2, 2012].

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Ferraro, D.J., L. Gakhar and S. Ramaswamy. 2005. Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and Biophysical Research and Communications* 338:175-190.
- Fuchs, R.L. 1994. Gene expression and compositional analysis from field-grown insect resistant cotton lines expressing full length *B.t.k.* HD-73 protein. Monsanto Technical Report, St. Louis, MO, USA.
- Goldstein, S.M. 2003. Life history observations of three generations of *Folsomia candida* (Willem) (Colembola: Isotomidae) fed yeast and Roundup Ready soybeans and corn. P 83. Masters thesis. Michigan State University.
- Gray, J., E. Wardzala, M. Yang, S. Reinbothe, S. Haller and F. Pauli. 2004. A small family of LLS1-related non-heme oxygenases in plants with an origin amongst oxygenic photosynthesizers. *Plant Molecular Biology* 54:39-54.
- Harayama, S., M. Kok and E.L. Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology* 46:565-601.
- Harvey, L. H., T.J. Martin, and D. Seifers. 2003. Effect of Roundup Ready wheat on greenbug, Russian wheat aphid, and wheat curl mite. *J. of Agr. and Urb. Ento.* 20(4):203-206.
- Hérouet, C., D.J. Esdaile, B.A. Mallyon, E. Debruyne, A. Schulz, T. Currier, K. Hendrickx, R.-J. van der Klis and D. Rouan. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134-149.
- Hibino, T., R. Waditee, E. Araki, H. Ishikawa, K. Aoki, Y. Tanaka and T. Takabe. 2002. Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 277:41352-41360.
- Illergård, K., D.H. Ardell and A. Elofsson. 2009. Structure is three to ten times more conserved than sequence - A study of structural response in protein cores. *Proteins* 77:499-508.
- ILSI-CERA. 2011. A review of the environmental safety of the PAT protein. International Life Sciences Institute, Center for Environmental Risk Assessment, Washington, D.C. http://cera-qmc.org/docs/cera_publications/pub_05_2011.pdf.
- Jamornman, S., S. Sopa, S. Kumsri, T. Anantachaiyong, and S. Rattithumkul. 2003. Roundup Ready corn NK603 effect on Thai greenlacewing, *Mallada basalis* (Walker) under laboratory conditions. Pp 29-30. Proc. Sixth Nat. Plant Protec. Conf., November 24-27, 2003.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Jasinski, J.R., J.B. Eisley, C.E. Young, J. Kovach, and H. Willson. 2003. Select nontarget arthropod abundance in transgenic and nontransgenic field crops in Ohio. *Env. Ent.* 32:407-413.
- Llewellyn, D. and G. Fitt. 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. *Molecular Breeding* 2:157-166.
- McGregor, S.E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. Agricultural Handbook No. 496. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, D.C.
- McPherson, R.M., W.C. Johnson, B.G. Mullinix, W.A. Mills, and F.S. Peebles. 2003. Influence of herbicide-tolerant soybean production systems on insect pest populations and pest-induced crop damage. *J. Econ. Ent.* 96:690-698.
- Nahas, E. 2001. Environmental monitoring of the post-commercialization of the Roundup Ready soybean in Brazil, Report 2. Pp 1-29. Microbiological Parameters.
- Nam, J.-W., H. Nojiri, T. Yoshida, H. Habe, H. Yamane and T. Omori. 2001. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65:254-263.
- Naranjo, S.E. 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environmental Entomology*, 34, 1193 – 1210.
- Niles, G.A. y Feaster, C.V. 1984. Cotton Agronomy No. 24, P. 205, Soil Science Society Of America, Inc. (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, Eds.), Wisconsin, USA.
- OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. ENV/JM/MONO(99)9 Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.10. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Palmer, S. J. and Beavers, J. B. 1993. Btk HD-73 protein: a dietary toxicity study with ladybird beetles (*Hippodamia convergens*). Monsanto Company Study No. WL-93-232. Submitted to EPA, MRID # 43145209.
- Palmer, S. J. and Krueger, H. O. 2000. Insect protection Protein 2: a dietary toxicity study with the ladybird beetle (*Hippodamia convergens*). Monsanto Company MSL-16172. Submitted to EPA, MRID # 4508631 1.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- Perry, J.N., Rothery, P., Clark, S.J., Heard, M.S., & Hawes, C. (2003). Design, analysis and statistical power of the farm-scale evaluation of genetically modified herbicide tolerant crops. *Journal of Applied Ecology*, 40, 17 – 31.
- Rathinasabapathi, B., M. Burnet, B.L. Russell, D.A. Gage, P.-C. Liao, G.J. Nye, P. Scott, J.H. Golbeck and A.D. Hanson. 1997. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of Glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:3454-3458.
- Rodoni, S., W. Mühlecker, M. Anderl, B. Kräutler, D. Moser, H. Thomas, P. Matile and S. Hörtensteiner. 1997. Chlorophyll breakdown in senescent chloroplasts (cleavage of pheophorbide a in two enzymic steps). *Plant Physiology* 115:669-676.
- Rosche, B., B. Tshisuaka, B. Hauer, F. Lingens and S. Fetzner. 1997. 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase: Phylogenetic relationship to other multicomponent nonheme iron oxygenases. *Journal of Bacteriology* 179:3549-3554.
- Russell, B.L., B. Rathinasabapathi and A.D. Hanson. 1998. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiology* 116:859-865.
- Schmidt, C.L. and L. Shaw. 2001. A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33:9-26.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 775-806.
- Siciliano, S.D., and J.J. Germida. 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the nontransgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29:263-272.
- Tanaka, A., H. Ito, R. Tanaka, N.K. Tanaka, K. Yoshida and K. Okada. 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proceedings of the National*
- Umbeck, P.F., K.A. Barton, E.V. Nordheim, J.C. McCarty, W.L. Parrott and J.N. Jenkins. 1991. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology* 84:1943-1950.
- Van Deynze, A.E., F.J. Sundstrom and K.J. Bradford. 2005. Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science* 45:1565-1570.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14:1274-1278.

Wendel, J.F., 1989. New World cottons contain Old World cytoplasm. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA* 86: 4132-4136.

Werlen, C., H.-P.E. Kohler and J.R. van der Meer. 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. Strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *Journal of Biological Chemistry* 271:4009-4016.

Yang, M., E. Wardzala, G.S. Johal and J. Gray. 2004. The wound-inducible *Lls1* gene from maize is an orthologue of the *Arabidopsis* *Acd1* gene, and the *LLS1* protein is present in non-photosynthetic tissues. *Plant Molecular Biology* 54:175-191.

III.j. Estudio de evaluación de los posibles riesgos conforme a la NORMA Oficial Mexicana NOM-002-SAG-BIO-SEMARNAT-2017, por la que se establecen las características y requisitos que deberán contener los estudios de evaluación de los posibles riesgos que la liberación experimental de organismos genéticamente modificados pudiera ocasionar al medio ambiente y a la diversidad biológica, así como a la sanidad animal, vegetal y acuícola.

Se entrega el documento Análisis de Riesgo del evento algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de acuerdo a la Norma de Análisis de Riesgo NOM-002-SAG-BIO-SEMARNAT-2017 (**ANEXO 36**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD.

IV.a. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

El objetivo principal del documento “Medidas de Bioseguridad para Ensayos Regulados de Campo”, es describir los lineamientos y mejores prácticas a implementar en las siembras de ensayos regulados de cualquier cultivo GM, incluyendo el transporte de semilla, siembra, manejo del cultivo y disposición de la producción del ensayo (**ANEXO 26. DMP-STW-LAN-001**).

PROPÓSITO

Proveer y describir lineamientos, metodologías y mejores prácticas para el manejo responsable de los materiales, ejecución y documentación, de manera que se cumpla con los términos y condiciones en los permisos para la siembra en campo en etapas reguladas con OGM.

ALCANCE

Los lineamientos, mejores prácticas y metodologías descritas en este documento serán seguidos por todas las personas involucradas en la planeación, mantenimiento, dirección y ejecución de las siembras en etapas reguladas con OGM.

IV.a.1. Plan de monitoreo detallado.

En el documento **DMP-STW-LAN-001 Medidas de Bioseguridad para Ensayos Regulados de Campo (ANEXO 26)** se describen las mejores prácticas de Monsanto para realizar las actividades de importación, transporte, almacenamiento, siembra, manejo del cultivo, cosecha, limpieza, disposición final y monitoreo de plantas voluntarias posterior a la cosecha.

Para verificar las medidas de monitoreo (inciso anterior) y asegurar el plan de monitoreo detallado, se implementarán auditorías de buen uso y manejo responsable de la tecnología, así como de Calidad, estas serán realizadas periódicamente para verificar la implementación de esta política, cumplimiento regulatorio y de buen uso y manejo responsable de la tecnología en cada función que participe en los ensayos regulados. Estas auditorías podrán ser realizadas en coordinación con el programa de auditorías del programa Excellence Through Stewardship™.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

IV.a.2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación.

Ver **ANEXO 26** y sección **IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD** de este documento.

IV.a.3. Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona de la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación.

Ver **ANEXO 26** y sección **IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD** de este documento.

IV.b. Medidas y procedimientos de bioseguridad.

IV.b.1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación.

Ver **ANEXO 26** (Sección sobre transporte y almacenamiento de semilla regulada).

IV.b.2. Medidas y procedimientos para disminuir el acceso de organismos vectores de dispersión, o de personas que no se encuentren autorizadas para ingresar al área de liberación a dicha zona o zonas.

No se permitirá el acceso a los predios donde se establezcan los estudios experimentales a ninguna persona que no esté debidamente acreditada por Monsanto.

El cruzamiento de variedades tetraploides de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 con especies silvestres diploides resulta altamente improbable. Aunque el cruzamiento natural es posible, el algodón es normalmente considerado un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984).

Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen del algodón es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. El polen se puede transferir por insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas mieleras. Sin embargo, las especies silvestres del género *Gossypium* son diploides, mientras que las variedades cultivadas de *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* son tetraploides. Esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide.

Las consecuencias ambientales de la transferencia de polen del evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 a otros algodones son consideradas despreciables debido a la limitada movilidad del polen del algodón, la inocuidad de las proteínas introducidas y la falta de cualquier ventaja selectiva conferida en la planta de algodón receptora. Se estima que el flujo génico interespecífico ocurra a niveles muy bajos,

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

disminuyendo rápidamente a casi cero con el incremento de la distancia entre la fuente de polen y las plantas receptoras. En general, el potencial de entrecruzamiento con parientes silvestres es poco probable debido al relativo aislamiento de la distribución de especies del género *Gossypium*, diferentes sistemas de cruzamiento e incompatibilidad genética.

Finalmente, el evento MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no exhibe ninguna característica fenotípica que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso remoto caso de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de las características de resistencia a insectos y tolerancia a los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato, no conferiría ventaja competitiva alguna en hábitats no agrícolas, dado que la tecnología funciona como una protección ante estímulos externos como la presión de insectos y aplicaciones de los mencionados herbicidas, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con el algodón convencional.

IV.b.3. Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas.

Los ensayos de evaluación del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se establecerán solo en los predios aprobados por la autoridad en el permiso correspondiente.

En caso de que ocurriera una liberación accidental de semilla de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, el incidente se mantendrá bajo control y se seguirá el protocolo de Manejo de Derrame y Liberación no intencional de material GM.

Se informará dentro de las primeras 24 horas de ocurrido el incidente al líder de Stewardship, todo el material recuperado deberá ser almacenado y controlado en un contenedor independiente y desvitalizado.

El responsable de Stewardship debe notificar al correo: libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx dentro de las 24 horas siguientes a que se tenga conocimiento de la misma e informar por escrito físicamente en un periodo de 3 días hábiles a la ventanilla de la situación de acuerdo con lo indicado en el artículo 59 del RLBOGM.

IV.b.4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar el OGM.

La semilla de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 se sembrará en campos de agricultores participantes en la Etapa Experimental y aprobados en el permiso correspondiente.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Por otro lado, el material vegetativo producto de las plantas de los estudios experimentales (GM y convencional, sin distinción) será destruido en el predio. Además, como medida de bioseguridad, se realizarán monitoreos de plantas voluntarias y se eliminarán por métodos mecánicos o químicos, disminuyendo de esta manera la posibilidad de intercambio.

Proponemos un aislamiento de 12 metros a la redonda en cada predio experimental de evaluación para la tecnología MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913. Este aislamiento es práctico y funcional, ya que se ha demostrado previamente la poca capacidad de dispersión del polen del algodón y que la tecnología ha demostrado su seguridad en estudios de laboratorio y en los ensayos de campo de Estados Unidos.

IV.b.5. Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado.

Para el Medio Ambiente

Los ensayos de evaluación del algodón MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 se establecerán solo en los predios aprobados por la autoridad en el permiso correspondiente.

En caso de que ocurriera una liberación accidental de semilla de algodón MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913, el incidente se mantendrá bajo control y se seguirá el protocolo de Manejo de Derrame y Liberación no intencional de material GM.

Se informará dentro de las primeras 24 horas de ocurrido el incidente al líder de Stewardship, todo el material recuperado deberá ser almacenado y controlado en un contenedor independiente y desvitalizado.

El responsable de Stewardship debe notificar al correo: libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx dentro de las 24 horas siguientes a que se tenga conocimiento de la misma e informar por escrito físicamente en un periodo de 3 días hábiles a la ventanilla de la situación de acuerdo con lo indicado en el artículo 59 del RLBOGM.

Además, se realizará monitoreo y destrucción de plantas voluntarias en el lugar del incidente hasta lograr controlar todas las plantas voluntarias que pudieran emerger. Este periodo puede variar en tiempo dependiendo del clima, disponibilidad de agua u otros factores.

Las consecuencias medioambientales de la introducción del evento de algodón MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 han sido consideradas y no existe razón para creer que tenga un impacto negativo en organismos no blanco. Además, existe evidencia para pensar que este evento reducirá el impacto ambiental del cultivo del algodón mediante la

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

reducción de aplicaciones de insecticidas sintéticos y del riesgo de desarrollo de resistencia en lepidópteros al *Bt*.

Monsanto ha presentado las evidencias científicas que demuestran que los productos derivados de algodones biotecnológicos son sustancialmente equivalentes en composición, propiedades funcionales, nutricionales y de seguridad en relación con los derivados de las variedades de algodón convencionales y difieren únicamente en las características biotecnológicas introducidas.

Para la Salud Humana

La evaluación de la inocuidad de los organismos GM se basa en una evaluación integrada, paso por paso y caso por caso; estando dirigida por los resultados de la comparación entre ese organismo y su homólogo convencional (algodón convencional).

La solicitud de Permiso ante la Secretaría de Salud está en redacción y se entregará dentro de poco tiempo. Al momento de entregar la solicitud para el Programa Piloto para este evento, ya se contará con esta autorización.

IV.b.6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación.

Ver **ANEXO 26** (Sección sobre cosecha y disposición final de materiales).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

V. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROMOVENTE.

V.a. Descripción de la zona en donde se realizó la liberación.

Evento MON 88702 MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

Liberaciones en Estados Unidos durante 2016.

El algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 fue liberado en el 2016 en Estados Unidos en los condados de Graham (Arizona), Perquimans (North Carolina), Tift (Georgia), Uvalde (Texas) and Washington (Mississippi). De estas localidades se colectaron tejidos de las plantas de algodón para realizar los análisis de expresión de proteínas. La descripción de las áreas de liberación se realiza con base en las ecorregiones Nivel III definidas por la Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA), las cuales sirven como marco espacial para el monitoreo de los ecosistemas de Canadá, Estados Unidos y México.

Graham (Arizona) - 12.1.1: Madrean Archipelago

Clima: La ecorregión presenta un clima subtropical seco, con veranos muy calientes e inviernos suaves. El rango de temperatura media anual va de 7 a 19°C. Tiene un periodo de 170 a 280 días sin nieve. La precipitación media anual es de 421 mm con rangos de 260 mm en zonas bajas, hasta 950 mm en las áreas de mayor altitud. Las mayores precipitaciones se dan entre julio y septiembre.

Vegetación: En las cuencas, pastizales semidesérticos y arbustos de estepa, con varios tipos de pastos como la grama negra y azul, así como mezquites, sotol, yuca, ocotillo, catos y agaves. En las laderas se pueden encontrar bosques de roble, pinos piñoneros y juníferos. En las zonas más altas se distribuye el pino ponderosa junto con el pino plancho, pino apache, pino Chihuahua y algunos ejemplares de abeto Douglas.

Hidrología: La hidrología superficial es escasa, la mayoría son corrientes efímeras e intermitentes. Los niveles de manto friático están decayendo.

Geomorfología: La zona se compone de cuencas y elevaciones típicamente entre los 100 a 1500 metros, las elevaciones mayores llegan a más de las 300m. Las rocas son del tipo volcánico y sedimentario Los suelos predominantes son los aridisol, inceptisol, molisol y alfisol.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Fauna: Las especies que se distribuyen en la ecorregión son el venado bura, puma, jaguar, coyote, gato montés, el antílope, liebre, ardilla zorro mexicana, halcón de Cooper, halcón, cuervo, buitres americano cabecirrojo, *Myiarchus cinerascens*, reyezuelo cañón, correcaminos, copetón cenizo, búho elfo, pájaro carpintero bellota, serpiente de cascabel occidental, lagartija cola de látigo occidental y monstruo de gila.

Uso de suelo-Actividades humanas: Los principales usos de suelo son la ganadería el pastoreo y la agricultura.

Perquimans (North Carolina) 8.5.1: Middle Atlantic Coastal Plain

Clima: El clima de la ecorregión es subtropical húmedo de media latitud. Tiene marcados veranos calurosos y húmedos, así como inviernos suaves. El rango de temperatura media anual va de 14°C en el norte, a 17°C en la parte sur. El periodo sin heladas es de 190 a 300 días. La precipitación media anual de 1,229 mm, con rango entre 1,020 y 1,420 mm.

Vegetación: Los bosques de la región anteriormente eran dominados por pinos de hoja larga y nogal, ahora principalmente por pino de incienso, pinos de hoja corta, parches de roble, liquidámbar y ciprés.

Hidrología: La región presenta corrientes y ríos de bajo gradiente, numerosos pantanos, marismas, estuarios y pocos lagos.

Geomorfología: Elevaciones bajas con planicies, terrazas bajas, dunas, islas de barrera y playas. El terreno se compone de una mezcla de suelos de textura fina y gruesa. Los suelos predominantes son el ultisol, entisol e histosol.

Fauna: La fauna de la región se compone de oso negro, venado cola blanca, gato montés, zorro gris, mapache, conejo de cola de algodón, ardilla gris, pavo salvaje, codorniz, paloma de luto, cormoranes, garzas, cardenal septentrional, tortuga de caja, la ave reinita cabecidora y cocodrilo.

Uso de suelo-Actividades humanas: Las plantaciones comerciales de pino son comunes con algunas áreas de cultivos como el trigo, maíz, soya, papa, algodón, moras y cacahuates. La producción pecuaria es predominante en algunas zonas. En las zonas costeras predominan el turismo y recreación.

Washington (Mississippi) / Tift (Georgia) 8.3.5: Southeastern Plains

Clima: El clima de la ecorregión es subtropical húmedo de media latitud. Tiene veranos calurosos y húmedos, así como inviernos suaves. El rango de temperatura media anual va de 13°C en el sur a 19°C en la parte norte. El periodo sin heladas es de 200 días en el norte a 300

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

en el sur. La precipitación media anual de 1,358 mm, con rango de 1,140-1,520 mm. La distribución de lluvias es bastante uniforme a lo largo del año.

Vegetación: La vegetación nativa está compuesta predominantemente por pinos de hoja larga con pequeñas áreas de roble, en el sur se presentan bosques mixtos con árboles de hayas, liquidámbar, magnolia, laurel, roble y pinos. Las llanuras de inundación albergan robles, árboles de maple, liquidámbar, olmo americano, con áreas de ciprés, y tupelo.

Hidrología: Existe una red de corrientes perenes y ríos, la red es moderada en las zonas bajas. Existen pocos lagos naturales, pero numerosas reservas de agua de gran tamaño.

Geomorfología: El relieve se compone de llanuras suaves. El terreno se compone de arenas limos y arcillas, con rocas metamórficas e ígneas, con presencia de roca caliza, pedernal y pizarra.

Fauna: Los mamíferos que se distribuyen en la ecorregión son: venado cola blanca, oso negro, zorro gris, gato montés, conejo ardilla oriental, ardilla gris y campañol de pino. Las aves son representadas por pavo salvaje, cardenal septentrional, herrerillo bicolor o carbonero cresta negra, chipe encapuchado, garzas y gargetas. La herpetofauna de la zona se compone del cocodrilo americano, tortuga de caja del este, serpiente jarretera o culebra rayada, serpiente cabeza de cobre y el crótalo adamantino o cascabel diamantino.

Uso de suelo-Actividades humanas: La región es un mosaico con cultivo de grano, pastura, maderables y cobertura forestal. Alberga grandes plantaciones de pino, en conjunto con zonas donde se cultiva algodón, maíz, soya, cebolla, papa dulce, melón y tabaco.

Uvalde (Texas) 9.4.1: High Plains

Clima: El clima es de estepa de media altura, más seco en la parte de las grandes planicies centrales al este, con marcados veranos calurosos e inviernos fríos. La temperatura media anual varía según la latitud, de 8°C en el norte a 17°C.

Vegetación: La vegetación históricamente predominante es de pradera, hoy en día está altamente alterada y presenta una mezcla de diversos pastos. Las áreas al sur presentan robles, yucas, artemisa, arbustos y pastos cortos.

Hidrología: La mayoría de las corrientes son intermitentes y efímeras. Hay pocos ríos que se originan al sur de las Rocallosas. La porción más sureña prácticamente no tiene corrientes de agua. El agua superficial de la zona se encuentra en numerosas pozas o playas efímeras que sirven como recarga del acuífero Ogallala.

Geomorfología: El terreno se compone de planicies suaves y ligeramente irregulares. En la porción sur destaca una plataforma elevada conocida como Llano Estacado. Las elevaciones a

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

través de la región van de 725 a 2,035 m. Las rocas que componen la zona son areniscas, limonitas, lutitas y capas de caliche. Los suelos predominantes son molisol, alfisol, entisol y aridisol.

Fauna: La fauna de la ecorregión está compuesta por visón, perritos de la pradera de cola negra, hurones de patas negras, lobo gris, puma, berrendo coyote, zorro, liebre, conejo de rabo blanco, águila real, así como numerosas aves acuáticas migratorias.

Uso de suelo-Actividades humanas: La agricultura y pastoreo son los principales usos de suelo. Así mismo, se producen petróleo y gas en varias zonas de la región.

Fuentes de Información

- Wiken, Ed, Francisco Jiménez Nava, and Glenn Griffith. 2011. North American Terrestrial Ecoregions—Level III. Commission for Environmental Cooperation, Montreal, Canada.
- Commission for Environmental Cooperation. 2009. Ecological Regions of North America (Vector digital data) Montréal, Québec, Canada. <http://www.cec.org/naatlas/>

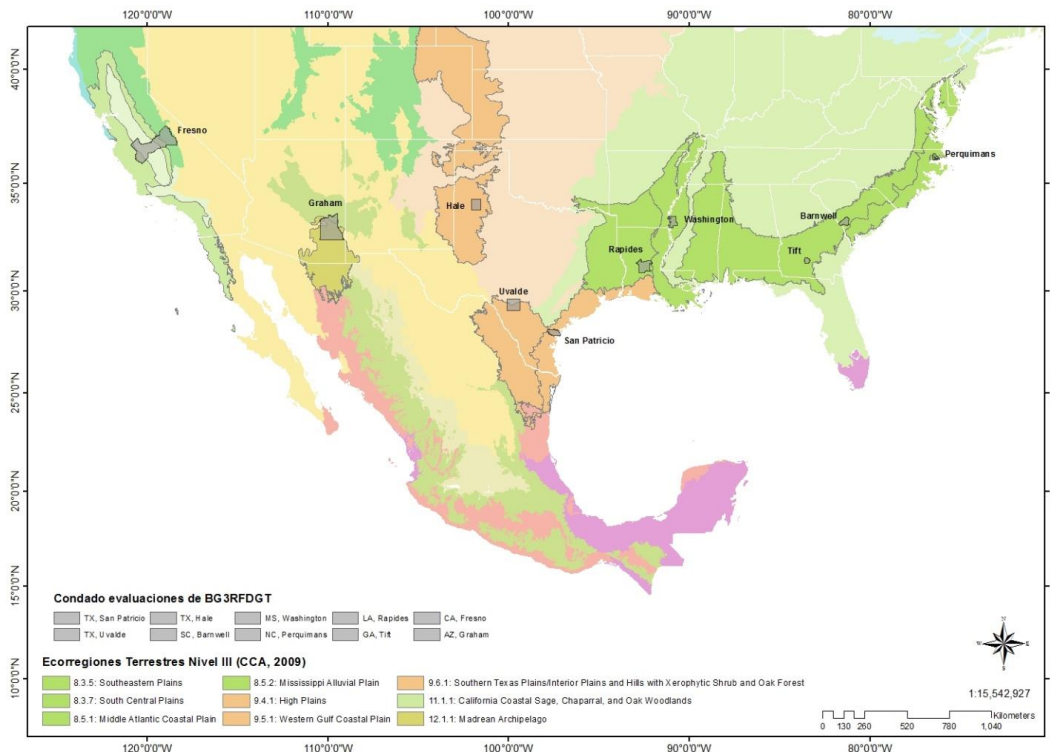


Figura 40. Liberaciones al ambiente de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en Estados Unidos (país de origen).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

V.b. Efectos de la liberación sobre la flora y fauna.

El algodón biotecnológico MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 expresa la proteína mCry51Aa2, que le confiere protección contra el daño por insectos hemípteros (*Lygus lineolaris*, *Lygus hesperus*) y tisanópteros (*Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella fusca*); también expresa las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y Vip3A, que le confieren resistencia al ataque de insectos lepidópteros (*Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella*, *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua*); además, la expresión de las proteínas CP4 EPSPS, DMO y PAT le confieren tolerancia a los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato de amonio, respectivamente.

Salvo las características de resistencia a hemípteros, tisanópteros y lepidópteros y tolerancia a los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato de amonio, ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional (Ver sección **III.e. Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto del organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica**, Págs. 182-183).

Por otro lado, las proteínas citadas no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 con el algodón convencional nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en los mencionados eventos como consecuencia de la modificación genética.

Por todo lo anterior, es posible afirmar que, salvo por la resistencia a los insectos y tolerancia a herbicidas, el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 es fenotípicamente igual que los algodones convencionales tanto en México como en otras regiones del mundo.

Interacciones ambientales.

Factores abióticos, daño por plagas y enfermedades

En un estudio comparativo entre el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y su control convencional, se evaluaron las respuestas a factores abióticos y daño por plagas y enfermedades que pudieran impactar su potencial de maleza (**ANEXO 17. MSL0029298 Evaluación Fenotípica e Interacciones Stack USA 2016**). Los

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

resultados de las observaciones sobre estresores abióticos como sequía, calor, estrés o viento indicaron que no hay diferencias biológicamente significativas entre el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y el control convencional, por lo tanto, ningún incremento en el potencial de maleza. Además, los datos de interacciones ambientales también indican que este algodón biotecnológico no confiere susceptibilidad o tolerancia de importancia biológica a enfermedades específicas o insectos plaga. Colectivamente, la información apoya la conclusión de que el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no tiene un potencial de maleza aumentado en comparación con el algodón cultivado comercialmente.

Organismos no blanco

Se han realizado estudios en campo con los eventos MON 88702 (2015 y 2016), que expresa la proteína mCry51Aa2, y MON 15985 (1999), que expresa las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab, para evaluar la abundancia de organismos no blanco (ONB), en comparación con el algodón convencional. Los resultados de los estudios indican que la presencia de las proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac y Cry2Ab no afectó la abundancia de ONB asociados al algodón (Ver sección **III.f. Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM**, Págs. 183-192).

Se ha evaluado ampliamente la seguridad de las proteínas CP4 EPSPS, DMO y PAT, que no poseen capacidad insecticida, y se ha confirmado su historial de uso seguro. La proteína CP4 EPSPS es similar a la proteína EPSPS nativa, que es ubicua en plantas y microorganismos en el ambiente. Por lo tanto, basados en esta historia de ocurrencia, no se espera que la proteína EPSPS posea actividad biológica hacia organismos no plaga. La proteína DMO comparte homología con una amplia variedad de oxigenasas presentes en bacterias y plantas prevalentes en el ambiente y consumidas, lo que establece que los animales y humanos están ampliamente expuestos a estos homólogos estructurales sin reportes de efectos adversos debidos a la proteína. La proteína PAT expresada en el evento MON 88701 es idéntica a la proteína nativa producida en la bacteria *S. hygroscopicus* y es análoga a las proteínas PAT en productos tolerantes a glufosinato de varios cultivos disponibles comercialmente como algodón, maíz, soya y canola. Se ha evaluado ampliamente la seguridad de la proteína PAT presente en cultivos derivados de biotecnología (ILSI-CERA, 2011) y en 1997 se extendió una exención de tolerancia para las proteínas PAT por la EPA (1997). Esta exención se basó en la evaluación de riesgo que incluyó digestión rápida en fluidos gástricos simulados, falta de homología significativa a toxinas y alérgenos conocidos, y falta de toxicidad un estudio de alimentación aguda oral (Ver sección **III.f. Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM**, Págs. 183-192).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Potencial de Maleza.

El algodón no está incluido en las referencias más importantes sobre malezas (Crockett, 1977; Holm *et al.*, 1997). No se considera que el algodón tenga características de maleza y no posee atributos comúnmente asociados con malezas, como larga persistencia en suelo, la habilidad de invadir y volverse especie dominante en ambientes nuevos o diversos, o la habilidad de competir exitosamente con vegetación nativa. Baker (1965) desarrolló un consenso general respecto a los rasgos comunes de malezas: ciclo anual, alta producción de semillas, alto porcentaje de germinación y poca dormancia, varias generaciones por año, gran capacidad de dispersión y extrema susceptibilidad a un herbicida en particular. El algodón no posee estas características de maleza y se define tradicionalmente como un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984).

Se reconoce que, en algunos sistemas agrícolas, el algodón puede ser planta voluntaria en un cultivo siguiente al que se rota. Sin embargo, las plantas voluntarias son controladas fácilmente a través de labranza o el uso de herbicidas apropiados (Alford *et al.*, 2002; Murdock *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2002).

No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas biotecnológicas de los diferentes eventos individuales utilizados para obtener algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en comparación con el algodón convencional, se ha ratificado en ensayos de campo experimentales y programas comerciales donde se han autorizado, lo que nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en este evento como consecuencia de la modificación genética.

Debido a lo anterior, el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no es considerado como una maleza y no representa un riesgo de convertirse en maleza más allá de lo que representarían los algodones convencionales.

Flujo de polen.

En la sección **III.h. Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas** (Págs. 193-195), se comenta lo relacionado con el flujo de genes mediado por polen y el proceso de introgresión en algodón. Además, en esa misma sección y en la sección **I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles** (Págs. 49-53), se revisa lo relacionado a la posibilidad de entrecruzamiento entre el algodón cultivado tetraploide (*G. hirsutum*) con otras especies tetraploides en México y también con las especies diploides del género *Gossypium*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Dadas las características biológicas del algodón, cuyo polen es pesado y con la información que confirma que la polinización cruzada disminuye a medida que las plantas receptoras se alejan de la fuente de polen (menos de 1% a 7 m de distancia) (Umbeck *et al.*, 1991), combinada con la ausencia de especies tetraploides sexualmente compatibles con el algodón cultivado, concluimos que la posibilidad de flujo de genes mediado por polen es mínima y la posibilidad de introgresión es insignificante.

V.c. Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen (descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad).

Evaluación de riesgo

La evaluación del riesgo es un proceso por el cual se evalúa el potencial de que se produzca un efecto perjudicial o peligroso contra la probabilidad de que dicho efecto se produzca realmente. Como tal, el riesgo tiene dos elementos claros: el peligro (o el daño) y la exposición (o la probabilidad de que ocurra el daño) cada uno de los cuales se caracteriza por separado antes de su integración en forma de estimación de riesgo. Si no existe ningún daño ni exposición significativa, el riesgo puede ser estimado como "insignificante". Si se identifica tanto el daño como la exposición, el riesgo se calcula considerando el peligro en el contexto de la exposición. Antes de emprender una evaluación de riesgo ambiental (ERA, por sus siglas en inglés) para un cultivo GM, es crítico comprender el potencial de ocurrencia de efectos perjudiciales científicamente razonables con base en nuestro conocimiento del cultivo, el rasgo que se introdujo, el medio ambiente receptor probable y las interacciones potenciales entre éstos. Para la identificación y la evaluación de riesgos ambientales de una planta genéticamente modificada, la estrategia de evaluación de riesgo procura establecer primero cuán diferente es la planta genéticamente modificada comparada con su contraparte convencional. Cuando se lleva a cabo en forma correcta, este enfoque permite al evaluador enfocarse sólo en las diferencias relevantes, aquellas que tienen un potencial razonable de afectar significativamente procesos ecológicos importantes, alterar la capacidad invasiva de la planta (potencial de maleza) o producir un impacto sobre organismos no blanco. Los datos de evaluación comparativa permiten que la evaluación del riesgo se concentre en los aspectos donde el medio ambiente receptor probable podría sufrir un impacto significativo. Por consiguiente, se realizan experimentos detallados de evaluación de riesgo sobre esas diferencias significativas.

El algodón es un cultivo con una larga historia de utilización a nivel mundial y sus derivados, incluyendo fracciones procesadas, también tienen un largo historial de uso seguro y consumo.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

El algodón se cultiva actualmente en siete estados del país y en cerca de 80 países a nivel mundial. En 2021 se reportó la siembra de 160,253.22 hectáreas de algodón en México, lo que permitió una producción de fibra de algodón equivalente a ~14,865 millones de pesos (SIAP, 2023).

Nuestro país es centro de origen y diversidad genética del algodón (Wendel *et al.*, 1992). Esta especie ha sido cultivada en México desde su domesticación, donde los restos arqueológicos más conocidos de algodón domesticado datan de aproximadamente 5,500-4,300 años antes del presente (A.P.) en la región central de México (ver sección **I.g. Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor**, Págs. 56-61).

Las especies relacionadas con el algodón cultivado tetraploide (*G. hirsutum*) se describen en la sección **I.b. Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México** (Págs. 46-49). Aunque en México se han documentado varias especies diploides pertenecientes al género *Gossypium*, éstas son sexualmente incompatibles con el algodón cultivado, que es tetraploide. Además del algodón *Gossypium hirsutum*, se han descrito otras cuatro especies de algodones tetraploides que sí son sexualmente compatibles, pero no se encuentran en México. En la cercanía de los predios propuestos para la liberación experimental del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no se localiza ninguna especie perteneciente al género *Gossypium*. En esta región solo se ha encontrado una colecta de la especie *G. hirsutum* en la base de datos de CONABIO, que se localiza a más de 10 km de los predios de evaluación (ver sección **I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles**, Págs. 49-53).

Por otro lado, aunque el cruzamiento natural es posible entre plantas de algodón, éste es normalmente considerado un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984) dado que el polen es pesado y pegajoso, y su dispersión por el viento es muy limitada. La literatura sobre el algodón muestra que la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen (McGregor, 1976; Llewellyn y Fitt, 1996; Umbeck *et al.*, 1991).

Por lo anterior, la transferencia de polen de MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 a otros algodones se considera insignificante (ver sección **III.h. Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas**, Págs. 193-195).

El algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con el algodón convencional. Salvo por la protección contra insectos plaga objetivo y la tolerancia a herbicidas, el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 es fenotípicamente igual que los algodones convencionales tanto en México como en otras regiones del mundo (ver secciones **III.d. Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el medio**

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

ambiente receptor del OGM (181-182) y III.e. Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto del organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica, Págs. 182-183).

En la evaluación de la respuesta a factores abióticos y daño por plagas y enfermedades que pudieran impactar el potencial de maleza del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, los resultados indicaron que no hay diferencias con el control convencional para estresores abióticos. Los datos de interacciones ambientales también indican que este algodón biotecnológico no confiere susceptibilidad o tolerancia de importancia biológica a enfermedades específicas o insectos plaga. Colectivamente, la información apoya la conclusión de que el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no tiene un potencial de maleza aumentado en comparación con el algodón cultivado comercialmente (ver sección **V.b. Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna**, Págs. 211-214).

De igual manera, en las evaluaciones de la abundancia de organismos no blanco en algodones biotecnológicos (expresando las proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac y Cry2Ab) y convencional, realizados en Estados Unidos, los resultados indicaron que no hay efectos adversos a comunidades de artrópodos tras la exposición significativa en campo a las proteínas biotecnológicas (**ANEXOS 18 y 19**).

Por otro lado, las proteínas que confieren tolerancia a herbicidas (CP4 EPSPS, DMO y PAT) no poseen capacidad insecticida y han sido evaluadas en numerosos estudios. El consenso establece que son proteínas cosmopolitas comunes en el ambiente y que no representan un riesgo de daños a la salud humana o al ambiente (ver sección **III.f. Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM**, Págs. 183-192).

El algodón no exhibe características de maleza y tampoco invade ecosistemas establecidos o se cruza con parientes silvestres que son malezas. No posee ninguno de los atributos comúnmente asociados con malezas, como larga persistencia de semilla en el suelo, habilidad de dispersión, invasión o de volverse una especie dominante en ambientes diversos y de competir exitosamente con la vegetación nativa.

No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

V.d. En caso de que el promovente lo considere adecuado. Otros estudios o consideraciones en los que se analicen tanto la contribución del OGM a la solución de problemas ambientales, sociales, productivos o de otra índole.

En los **ANEXOS 4-25 y 36** se discuten estudios muy completos acerca del evento MON 88702 x MON 15985 x COT102 x MON 88701 x MON 88913 o de los eventos individuales a partir de los cuales se generó, relacionados con su caracterización y seguridad. Además, los estudios costo-beneficio realizados en los programas experimentales y pilotos en las regiones algodoneras del norte de México con algodón biotecnológico conteniendo tecnologías anteriores, han demostrado el beneficio económico producto de la diferencia en rendimiento y ahorros en aplicaciones de insecticidas, herbicidas y actividades culturales.

V.e. En caso de importación, copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen.

A continuación, se presenta la documentación que acredita que el OGM está permitido en el país de origen para su liberación al ambiente:

- a) Permiso de uso experimental expedido por la EPA para el evento MON 88702 el 30 de enero de 2019 (Autorización experimental equivalente al Permiso de Liberación al Ambiente en Etapa Experimental en México) (**ANEXO 27. Autorización Experimental MON 88702 EPA**).
- b) Desregulación del algodón Bollgard®II (MON-15985-7 x MON-88913-8) por parte de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) el 8 de septiembre de 2008 (**ANEXO 28. Bollgard®II EPA**).
- c) Desregulación del algodón Bollgard®II (MON-15985-7 x MON-88913-8) por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 (**ANEXO 29. Bollgard®II FDA**).
- d) Desregulación del algodón Bollgard®II (MON-15985-7 x MON-88913-8) por parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 (**ANEXO 30. Bollgard®II USDA**).
- e) Desregulación del algodón Solución Faena Flex® (MON-88913-8) por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 (**ANEXO 31. Solución Faena Flex® FDA**).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

- f) Desregulación del algodón Solución Faena Flex® (MON-88913-8) por parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 (**ANEXO 32. Solución Faena Flex® USDA**).
- g) Desregulación del algodón DGT® (MON-887Ø1-3) por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) del 24 de abril de 2013 (**ANEXO 33. DGT FDA**).
- h) Desregulación del algodón DGT® (MON-887Ø1-3) por parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) del 12 de enero de 2015 (**ANEXO 34. DGT USDA**).

Para las desregulaciones de la USDA, FDA y EPA de Estados Unidos sobre el evento COT102, consultar la información del evento COT102 entregada por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud experimental de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Monsanto.

VI. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RIESGOS DE LAS ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS CON QUE SE CUENTE PARA CONTENDER CON EL PROBLEMA PARA EL CUAL SE CONSTRUYÓ EL OGM, EN CASO DE QUE TALES ALTERNATIVAS EXISTAN.

Monsanto ha desarrollado el algodón con eventos apilados MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913. Este evento apilado se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos individuales MON 88702, Bollgard®III [que es un evento apilado por cruce mendeliano que se compone de los eventos Bollgard®II, MON 15985, y COT102], Solución Faena Flex® (MON 88913) y DGT® (MON 88701).

Este evento expresa siete proteínas biotecnológicas, una lo protege contra el daño por insectos hemípteros y tisanópteros plaga objetivo (mCry51Aa2), tres para control de insectos lepidópteros plaga objetivo (Vip3A, Cry1Ac y Cry2Ab) y tres que le confieren tolerancia a los herbicidas glifosato (CP4 EPSPS), dicamba (DMO) y glufosinato (PAT), respectivamente.

El algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 ofrece a los agricultores alternativas adicionales para aumentar la eficiencia del control de maleza y del control de plagas objetivo en el cultivo de algodón. Hablando en general, MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 no requiere cambios en las prácticas agronómicas, sin embargo, se esperan cambios específicos en las prácticas respecto a las

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

características de protección contra insectos plaga y tolerancia a los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato. Estas características proveen los beneficios del producto. Los mayores beneficios del uso de la tecnología MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 para los productores son:

I. Control de un amplio espectro de especies de maleza: los herbicidas glifosato, dicamba y glufosinato de amonio controlan de manera eficiente y segura la maleza de hojas anchas y gramíneas, incluso las especies resistentes a otros herbicidas.

II. Mayor flexibilidad para el control de maleza: en los cultivos tolerantes a herbicidas, éstos son aplicados sobre la maleza después de la emergencia del cultivo. Las aplicaciones son necesarias sólo cuando la infestación de maleza alcanza niveles de daño económico, pudiendo reducir la productividad y la calidad del producto.

III. Alta compatibilidad con técnicas de conservación de suelo: los beneficios del barbecho, preparación conservacionista de suelo, como plantío directo, incluyen la mejora de la calidad del suelo, el aumento de la infiltración de agua, la reducción de la erosión y de sedimentos en las fuentes de agua, la reducción de la pérdida de nutrientes y pesticidas para las aguas de superficie, la mejora del hábitat para la vida silvestre, la mejora de la retención de carbono en el suelo, la reducción del uso de combustible y la utilización de prácticas agrícolas más sustentables.

IV. Uso de un herbicida con bajo riesgo para la salud humana: en las condiciones de uso de los productos registrados y en las recomendaciones técnicas, el glifosato no causa efectos adversos sobre la salud humana.

V. Disminución de los costos para el control de maleza: el costo del control realizado con glifosato, dicamba y glufosinato es competitivo en relación con el costo de opciones alternativas de control, especialmente en función de la gran eficacia del control de maleza. Tanto grandes como pequeños productores se benefician de esta tecnología de manera semejante.

VI. Reducción de la necesidad de pulverizar insecticidas convencionales para el control de las principales plagas de algodón, como *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella* y *Helicoverpa zea* y otros insectos del orden *Lepidoptera*, además de los insectos hemípteros y tisanópteros como chinche lygus y thrips. A través de la expresión de las proteínas mCry51Aa2, Cry1Ac, Cry2Ab y Vip3A, los algodones MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 controlan los daños causados por estos insectos a lo largo de la temporada y proporciona un mayor rendimiento con un menor número de aplicaciones de insecticidas de amplio espectro.

VII. Una menor exposición a los insecticidas reduce el riesgo para la salud humana. Disminución de los costos para el control de plagas blanco: el costo del control realizado con la reducción en el uso de insecticidas en relación con el costo de opciones alternativas de control. Tanto como pequeños productores se benefician de esta tecnología de manera semejante.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

Los resultados en países donde el algodón biotecnológico es producido por pequeños productores demuestran que estas tecnologías traen beneficios tanto para los pequeños agricultores, con producción menos sofisticada, como también para los grandes agricultores, que practican una producción técnicamente más avanzada.

Las alternativas al uso de los eventos biotecnológicos de Monsanto son el uso de insecticidas y herbicidas alternos con el impacto al ambiente que esto supone.

VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O BIORREMEDIACIÓN.

Se anexa la Autorización emitida por la COFEPRIS (Secretaría de Salud) para el evento algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (**ANEXO 35. Autorización COFEPRIS Algodón Lygus Stack**).

VIII. LA PROPUESTA DE LA VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA

La presente Solicitud de Permiso de Liberación al Ambiente en **ETAPA EXPERIMENTAL** para el organismo genéticamente modificado algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, contempla el ciclo agrícola Primavera – Verano de 2024 en la ecorregión nivel IV descrita en el punto **II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM**, que se localiza en la región de **Tamaulipas Norte**.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

A. La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte

Para realizar el Protocolo 1 (**ANEXO 1**) se solicitan 0.2 ha totales y 5.6 kg de semilla de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (Con esta superficie y semilla se sembrarán un máximo de 4 predios de evaluación).

Para realizar el Protocolo 2 (**ANEXO 2**) se solicitan 0.8 ha totales y 24.64 kg de semilla de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 (Con esta superficie y semilla se sembrarán un máximo de 4 predios de evaluación).

En total se sembrará 1 hectárea de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 con 30.24 kg de semilla (0.25 ha y 7.56 kg de semilla por cada predio).

Ruta de movilización

Monsanto importará la semilla de algodón biotecnológico MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 de Estados Unidos de América de acuerdo con la cantidad especificada en el permiso correspondiente y se almacenará en el **almacén para semilla regulada** de Monsanto en Los Mochis, Sinaloa. De esta localidad se moverá la semilla a los sitios experimentales localizados en Tamaulipas Norte.

Lugar de origen de la semilla:

Delta & Pine Land 100 Main St., Scott, MS 38772	Delta & Pine Land Highway 70 Aiken, TX 79221	Delta & Pine Land 15790 S. Highway 87 Eloy, AZ 85231	Delta & Pine Land Co. 610 2nd Street Indianola, MS 38751
---	--	--	--

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS**Destinos intermedios:****Agencias aduanales.**

No.	ADUANA	DIRECCIÓN	MUNICIPIO	LATITUD	LONGITUD	LATITUD	LONGITUD
1	GUADALAJARA	Aeropuerto Internacional Miguel Hidalgo. Municipio de Tlajomulco de Zúñiga. Guadalajara, Jalisco. C.P. 45659.	Tlajomulco de Zúñiga	20° 31' 28.98"	-103° 17' 58.76"	20.524717	-103.299656
2	TOLUCA	Boulevard Miguel Alemán Valdés esq. Agustín Millán. Col. San Pedro Totoltepec, Toluca, Edo. de México. C.P.50200.	Toluca	19° 20' 15.9"	-99° 34' 16.6"	27.337750	-99.571278
3	NUEVO LAREDO	Carretera Nuevo Laredo-Piedras Negras Km. 12.5. Puente Internacional de Comercio Mundial Nuevo Laredo III.	Nuevo Laredo	27° 35' 42.67"	-99° 32' 41.42"	27.595186	-99.544839
4		Puente internacional 2 "Juárez-Lincoln". Av. Leandro Valle y 15 de junio, Plataforma Fiscal, Sector Centro, Nuevo Laredo, Tamaulipas. C.P. 88000.	Nuevo Laredo				
5	MATAMOROS	Acción Cívica y División del norte s/n. Col. Doctores. Matamoros, Tamaulipas. C.P. 87430. Tel: 01 868 811 0101, 811 0130.	Matamoros	25° 52' 47"	-97° 30' 15"	25.879722	-97.504167
6	NOGALES	Puerto Fronterizo Nogales III. Nuevo Corredor Fiscal Km. 12. Nogales, Sonora. C.P.84000. Teléfono: 01 631 311 0301; 311 0302.	Nogales	31° 19' 7"	-110° 56' 45"	31.318611	-110.945833
7	CD. JUÁREZ	Sección Aduanera del Puente Internacional Zaragoza Isleta s/n. Col. Waterfil, Cd. Juárez, Chihuahua.	Juárez	31° 40' 16.87"	106° 20' 02.34"	31.6713528	-106.3339833
8	CD. DE MÉXICO	Aduana de Aeropuerto Internacional de México. Av. 602 No.161. Col. San Juan de Aragón, México, D.F. C.P. 15620.	Distrito Federal	19° 26' 38.29"	-99° 04' 27.74"	19.4439694	-99.07437222
9	MEXICALI	Organización Aduanal Martínez. Blvd. Abelardo L. Rodríguez. Col. Alamitos s/n. C.P. 21210. Teléfono: 01 686 551 5211.	Mexicali	32° 39' 31.34"	-115° 22' 32.79"	32.6587056	-115.375775
10	MANZANILLO	Bldv. Miguel de la Madrid s/n. Edificio Centro Integral de Gestiones Portuarias. Col.	Manzanillo	19° 04' 33.16"	-104° 17' 09.77"	19.07587778	-104.2860472
11	VERACRUZ	Aduana de Veracruz. Km. 3.5 Carretera San Juan de Ulúa Interior del Recinto Fiscal Zona Centro. Veracruz, Veracruz. C.P. 91700.	Veracruz				

Almacén

Monsanto.

Almacén de semilla regulada en Planta Asgrow en Los Mochis, Sinaloa.

Dirección: Carretera Internacional Km 1616, Los Mochis, Sinaloa.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE MONSANTO.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL.

ALGODÓN MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.

REGIÓN AGRÍCOLA DE **TAMAULIPAS NORTE** (Ecorregión 9.5.1.2 *Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente*).

CICLO PRIMAVERA – VERANO 2024.

DEPARTAMENTO DE ASUNTOS REGULATORIOS

B. El diseño experimental que se llevará a cabo durante la liberación en fase experimental.

Los protocolos que se implementarán durante las evaluaciones experimentales de algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en Tamaulipas Norte son los siguientes:

Protocolo 1: Caracterización Agronómica y Fenotípica e Interacciones Ambientales del Algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en Etapa Experimental en Localidades de México en 2024 (**ANEXO 1**).

Diseño experimental: Bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se utilizarán el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 como material de prueba, su control convencional (variedad DP 393) y cuatro referencias convencionales comerciales.

Protocolo 2: Eficacia biológica y abundancia de organismos no blanco en el algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 en Etapa Experimental en Localidades de México en 2024 (**ANEXO 2**).

Diseño experimental: Bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se utilizarán tres tratamientos:

- 1) Algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913, sin aplicaciones de insecticidas contra las plagas objetivo,
- 2) Control convencional (variedad DP 393), sin aplicaciones de insecticidas contra las plagas objetivo del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913 y,
- 3) Control convencional (variedad DP 393) con aplicaciones de insecticidas contra las plagas objetivo del algodón MON 88702 × MON 15985 × COT102 × MON 88701 × MON 88913.