Bayer CropScience

SOLICITUD DE PERMISO PARA LA LIBERACIÓN AL AMBIENTE

EN ETAPA EXPERIMENTAL

PARA LA SOYA GENÉTICAMENTE MODIFICADA LibertyLink®,

Evento A5547-127 Id. Único OECD: ACS-GM006-4

ZONAS AGRICOLAS DEL POLIGONO PENINSULA DE YUCATAN

DURANTE EL CICLO AGRICOLA PRIMAVERA-VERANO 2014.

3 DE DICIEMBRE DE 2013

CONTENIDO

Descripción.	Página
Listado de documentos anexos de respaldo de la información contenida en la solicitud……	10
I Caracterización del OGM ……	12
a) Identificador único del evento de transformación de organismos internacionales de los que México sea parte, cuando exista…….……	12
b) Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México……..…	12
c) Especificación de la existencia de especies sexuales compatibles……..…	14
d) Descripción de los hábitats donde el OGM puede persistir o proliferar en el ambiente de liberación…….	15
e) Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética……..	16
f) País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido……	16
g) Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor……	17
h) Secuencia génica detallada del evento de transformación incluyendo tamaño del fragmento insertado, sitio de inserción de la construcción genética, incluyendo las secuencias de los oligonucleótidos que permitan la amplificación del sitio de inserción…….	18
i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas y los resultados de los experimentos que comprueben los datos anteriores, así como la expresión de mensajeros del evento de transformación genética, incluyendo la demostración de los resultados……	21
j) Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres producto de los genes insertados, expresión de las proteínas y localización de las mismas……	25
k) Descripción del método de transformación……	27
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 los efectos no esperados……	29
m) Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas por el OGM, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples……	30
n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios……	30
o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos……	31
p) Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras incluyendo	

promotores, terminadores y otras, y su descripción, número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora……. 33
q) Patogenicidad o virulencia de los organismos donadores y receptores…… 33
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…… 37
s) Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgen…….. 37
t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados……... 42

II Identificación de la zona o zonas donde se pretenda liberar el OGM…. 44
a) Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación. 44
b) Ubicación, en coordenadas UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación…… 44
c) Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según las características de diseminación del OGM de que se trate…… 47

III Estudio de los posibles riesgos que la liberación de los OGMs pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica a los que se refiere el artículo 42, fracción III de la Ley. Contendrá, además de lo dispuesto en el artículo 62 de la Ley, la información siguiente:…… 50
a) Estabilidad de la modificación genética del OGM……. 50
b) Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína de interés en los diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren…… 55
c) Características del fenotipo del OGM……. 57

d) Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y en el medio ambiente receptor del OGM……. 58
e) Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya al menos, ciclo biológico y cambios en la morfología básica…… 58
f) Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que se pueden derivar de la liberación del OGM……. 59
g) Descripción de uno o más métodos de identificación del evento específico del OGM, incluyendo niveles de sensibilidad y reproducibilidad, con la manifestación expresa del promovente de que los métodos de identificación son los reconocidos por el desarrollador del OGM para la detección del mismo……. 60
h) Existencia de potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas… 60
i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados……. 61

IV. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad y de bioseguridad a llevar a cabo…… 62

a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad…… 62

1. Plan de monitoreo detallado…… 61
2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM, con el fin de detectar cualquier interacción entre el OGM y especies presentes relevantes, directa o indirectamente, en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación, cuando existan…… 63
3. Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación…… 64

b) Medidas y procedimientos de bioseguridad…… 64

1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación…… 65
2. Medidas y procedimientos para disminuir el acceso de organismos vectores de dispersión, o de personas que no se encuentren autorizadas para ingresar al áreas de liberación a dicha zona o zonas…… 65
3. Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas. 66
4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretende liberar experimentalmente el OGM…… 66
5. Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado…… 66
6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de liberación……. 66

V. Antecedentes de liberación del OGM en otros países, cuando esto se haya realizado, debiendo anexar la información pertinente cuando ésta se encentre al alcance del promovente…… 67

a) Descripción de la zona en donde se realizó la liberación…… 67
b) Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna…… 68
c) Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen, cuando haya sido requerido por la autoridad de otro país de origen, cuando haya sido requerido por la autoridad de otro país y se tenga acceso a él. La descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad establecidos deberá incluirse en el estudio….. 69
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, así como las consideraciones socioeconómicas que existan respecto de la liberación de OGMs al ambiente. Estos análisis deberán estar sustentados en evidencias científicas y técnicas, en los antecedentes sobre uso, producción y consumo, y podrán ser considerados por las Secretarías competentes como elementos adicionales para decidir sobre la liberación experimental al ambiente, y consecuentes liberaciones al ambiente en programa piloto y comercial,

respectivamente, del OGM de que se trata…… 70

e) En caso de importación copia legalizada o apostillada de la autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen, al menos para su liberación experimental, traducida al español. La Secretaría competente, de considerarlo necesario, podrá requerir copia simple de la legislación aplicable vigente en el país de exportación traducida al español…… 70

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…… 71

VII. Número de autorización expedida por SALUD cuando el OGM tenga finalidades de salud pública o se destine a la biorremediación. En caso de no contar con la autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente anexa a un escrito libre, en el que se indique el número de autorización…… 73

VIII. La propuesta de vigencia para el permiso y los elementos empleados para determinarla…… 73

Referencias…….. 74

Anexos: Polígonos

Autorización de OGM en país de origen, apostillado y traducción oficial.

1. **Nombre, denominación o razón social de quien promueve**

   Bayer de México S.A. de C.V.
   División CropScience
   Miguel de Cervantes Saavedra No. 259
   Col. Ampl. Granada, Del. Miguel Hidalgo
   11520, México, D.F.
   Tel. 5728 3000

2. **Nombre de los responsables del seguimiento a las pruebas de campo (Se autoriza de acuerdo al artículo 5 del reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados para recibir notificación vía electrónica)**

   Ing. Bitia Osorio Trejo
   Tel. 5728 3000 Ext 2786
   Tel cel: 55 41922296
   Email: bitia.osorio@bayer.com

   Dr. Luis Arciga Reyes
   Tel. 5728 3000 Ext 2726
   Tel cel: 5512954096
   E-Mail: luis.arciga@bayer.com

   Ing. Abraham Sandoval Rodríguez
   Tel. 5728 3000 Ext 2744
   Tel cel: 55 32325700
   E-Mail: abraham.sandoval@bayer.com

   M.Sc. Josefina Perea Díaz
   Tel. 5728 3000 Ext 2731
   Tel cel: 55 4880 3010
   E-Mail: josefina.perea@bayer.com

Personas que desarrollaron el producto y que pueden ampliar la información

La empresa que desarolló este producto fue:

Agracetus, Inc.

Middleton, Winsconsin. USA.

Responsable: Chuck Hansen. USA. Tel. 515-677-2605; 515-201-8847

***Currículum Vitae* de los involucrados en la liberación del OGM**

Dr. Luis Arciga Reyes –Gerente de Seeds México y Centroamérica

En los últimos diez años ha trabajado en el campo de la Biotecnología Agrícola, tanto en la investigación como en la industria. Es responsable del registro de cultivos biotecnológicos de Bayer de México, así como del seguimiento a las liberaciones de OGM al ambiente mediante lineamientos de gestión responsable y con respeto a las regulaciones existentes en el país.

Formación Académica

- Ph D en Biología Molecular de las Plantas: The University of Nottingham, UK. 2003
- M.C. en Fruticultura: Colegio de Postgraduados, México. 1998
- Ing. Agron. Parasitólogo: Universidad Autónoma Chapingo, México. 1992

Experiencia Profesional

- Asuntos Regulatorios para BioScience: Bayer de México S.A. de C.V. Enero 2008 a la fecha
- Consultor en Asuntos Regulatorios. Bayer de México S.A. de C.V. Agosto 2007 - Diciembre 2007
- Research Fellow: The University of Leeds, UK. Septiembre 2003 – Octubre 2007

IBQ. Bitia Osorio Trejo – Gerente de Regulación Seeds & Traits

A partir de 2004 ha trabajado en Regulación de Agroquímicos de acuerdo a la normatividad mexicana, los primeros tres años en la COFEPRIS-SA como responsable en la evaluación y otorgamiento de registros de plaguicidas y los últimos cuatro en la Industria, desempeñando funciones de Especialista en Regulación para la obtención de registros, permisos de importación, dictámenes técnicos de efectividad biológica y diversas autorizaciones para agroquímicos. Desde 2010 colabora en el Departamento de Biotecnología de la división CropScience de Bayer de México, S.A. de C.V. como responsable de regulación y cumplimiento.

Formación Académica

- Diplomado en Sistemas Integrados de Gestión bajo el contexto de la Responsabilidad Social Empresarial: Universidad Tecnológica de Wismar, Alemania. 2006
- Ingeniero Bioquímico: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México. 2002

Experiencia Profesional

- Gerente de Regulación en Biotecnología: Bayer de México S.A. de C.V., división CropScience. Agosto 2010 – a la fecha
- Especialista de Registros: Bayer de México S.A. de C.V., división CropScience. Junio 2007 – Julio 2010
- Gerente de Registro de Plaguicidas: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios- SSA, Enero 2005 - Mayo 2006
- Evaluador Químico de Registro de Plaguicidas: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios- SSA, Enero - Diciembre 2004

M.Sc. Josefina Perea Díaz. – Especialista de Regulación y Cumplimiento Seeds & Traits.

Con una experiencia de 20 años en regulación de agroquímicos y asesoría en fitosanidad para varios cultivos. Ha colaborado en la Dirección General de Sanidad Vegetal en regulación de insumos fitosanitarios y posteriormente con varias empresas de productos de protección vegetal. También, en calidad de consultor externo con empresas como Chemtura o Cheminova y fue gerente tanto del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Distrito Federal como de Sumitomo Agro Co para registro de agroquímicos. Ha trabajado también como inspector fitosanitario en verificación en origen en E.E.U.U. e investigación en biología vegetal en Alemania.

Formación Académica

- Maestría en Ciencias de Agricultura: en la Universidad Hebrea de Jerusalem.1999-2000.
- Ingeniero Agrónomo especialista en Parasitología Agrícola: Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 1993.

Experiencia Profesional

- Fitosanidad en jatropha en la península de Yucatán. 2011-2013
- Investigación en la Universidad de Würzburg. Alemania. 2007-2010.
- Gerente de Regulación en Sumitomo. 2006. También Gerente técnico en el Comité Estatal de Sanidad Vegetal. 2005-2006.
- Inspector en Origen en E.E.U.U. durante 2001.
- Especialista de registros en diversas empresas de agroquímicos y entidades federales. México. 1993-2006.

Ing. Abraham Sandoval Rodríguez – Coordinador de Mercadeo y Desarrollo Seeds.

Formación Académica

2002 – 2006 Universidad Autónoma Chapingo *Ingeniero Agrónomo Especialista En Parasitología Agrícola.

Experiencia Profesional

2010 – Actual Bayer de México en la División de Seeds
Asesor Técnico de Servicios

- Coordinación en campo de los ensayos de algodón establecidos para su desarrollo.
- Encargado del Sistema de Información Geográfica de las liberaciones de Algodón Genéticamente Modificado al ambiente.

- Promoción y mercadeo de productos.

2009 Dirección de Organismos Genéticamente Modificados del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

- Encargado del Departamento de Regulación de Organismos Genéticamente Modificados
- Coordinación del proceso de Regulación y análisis de solicitudes de OGM, así como la emisión de permisos de liberación al ambiente y su seguimiento.
- Elaboración y seguimiento de la consulta pública de OGM en el Micrositio del SENASICA y coordinación del desarrollo de sistemas de información aplicables a la regulación de OGM.

2008 Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)
Enlace de Epidemiología Cuarentenaria

- Búsqueda de información técnico científica disponible en el país y en las bases de datos internaciones para establecer y sustentar criterios de control y erradicación de plagas.
- Desarrollo e implementación de sistemas de Bases de Datos basadas para validar métodos estadísticos y modelos epidemiológicos.
- Desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas.
- Capacitación del personal técnico en los estados para la toma de datos en campo.

LISTADO DE DOCUMENTOS ANEXOS.

Documentos de respaldo de la información contenida en la solicitud.		
Descripción de la construcción genética	Moens 2012 . Description of Vector pB2/35SacK. Aventis CropScience Gent. Internal Report ID pB2/35SAcK-03. 10 pages. #C020823	M-143015-04-2
Secuencia de *pat*	De Beuckeleer M. 2004a. Description of the base pair sequences of the pat gene. Bayer BioScience NV. Internal Report. 5 pages. #C040035	M-228121-01-1
Caracterización de *pat*	Freyssinet M. 2002a. General description of the bacterial gene pat and its gene product PAT as used for producing plants with a genetically-based tolerance to Liberty® Herbicide. Bayer CropScience. Internal Report. 24 pages. #C025020	M-208497-01-1
Estabilidad del inserto	De Beuckeleer M. 1998. Molecular Demonstration of the Stability of the Integration of Glycine max Transformation Event A5547-127 Plant Genetic Systems NV. Internal Report ID Stability Analysis. 13 pages.	M-183196-01-1
	Van Wert S. 2009. Mendelian Inheritance and Agronomic Performance of Event A5547-127. AgrEvo USA Co. Internal Report. 30 pages.	M- 181487-03-1
Caracterización de las secuencias flanqueantes	De Beuckeleer M. 2002. Analysis of the nature of the flanking sequences from Glycine max event A5547-127 Bayer CropScience NV. Internal Report. 22.	M-217836-03-1
	De Pestel K., Tanghe S. 2007 Bioinformatics analysis of the pre-insertion locus of Glycine max transformation event A5547-127. Bayer BioScience NV. Internal Report. 38 pages.	M-296123-01-1.
Identificación de nuevos ORF	De Pestel K. 2007. Bioinformatics analysis of newly created ORFs from soybean transformation event A5547-127. Bayer BioScience NV. Internal Report. 20 pages	M-291938-03-1
Secuencia de PAT	De Beuckeleer M. 2004b _PAT. Description of the amino acid sequence of the PAT protein encoded from the pat gene. Bayer BioScience NV. Internal Report. 5 pages. #C040027	M-135134-03-1
Evaluación de bioseguridad de PAT	Capt 2012b. PAT protein from pat gene - Epitope homology and N-glycosylation searches. Bayer CropScience. Internal report	M-217013-06-1
	Capt A. 2012a. PAT/*pat* protein amino acid sequence homology search with known toxins. Bayer CropScience. Internal report	M-266573-05-1
	Capt A. 2007a. Assessment of the toxicity and allerginicity of the PAT protein (*pat* gene). Bayer CropScience Internal Report. 63 pages.	M-142779-04-1
Equivalencia de PAT coli-plantas	Currier T., Hendrickx K. 2007. Structural and Functional Equivalence of Pat/pat protein produced in Escherichia coli and A5547-127 soybean, Glycine max. Bayer CropScience. Internal Report. 25 pages.	M-284738-01-2
Contenido de PAT en tejidos y durante el ciclo de la planta, en sus subproductos y análisis composicional	De Wulf A., De Pestel K. 2007. PAT protein contents in leaf, stem and root tissues throughout the life cycle of the glufosinate tolerant soybean event A5547-127. Bayer BioScience NV. Internal Report. 35 pages.	M-293325-01-1
	Shillito R. 2003 Phosphinothricin Acetyltransferase content of Processed Fractions of Group 5 (Event A5547-127) Glufosinate-tolerant Soybean, USA, 1999.Final Report. Bayer CropScience. Internal Report. 44 pages.	M-238895-02-1
	Oberdoerfer R. 2012. Nutritional Impact Assessment Report on Glufosinate Ammonium Tolerant Soybean Transformation Event A5547-127	M-360323-02-1
Ensayo de alimentación en pollos	Leeson S. 1998. The effect of Glufosinate resistant soybeans (A5547-127) on the growth of female broiler chickens. University of Guelph. 13 pages.	M-141259-01-1
Ensayos de PAT en SGF	Rascle 2009b. In vitro digestibility studiy in human simulated gastric fluid. Internal Report SA09048. 40 pages.	M-214025-04-1

Ensayos de PAT en SIF	Rascle 2009c. In vitro digestibility studiy in human simulated intestinal fluid. Internal Report SA09048. 37 pages.	M-214021-03-1
Estabilidad térmica de PAT	Rascle J. 2009a. PAT/pat protein. Heat stability study. Internal Report Study SA09050. 34 pages.	M-131221-04-1
Performance agronómica del evento	Kowite W. 2008. Comparative Assessment of Morphological and Agronomic Characteristics of Glufosinate-tolerant Soybean A5547-127, USA, 2006-2007. Bayer CropScience. Internal Report. 45 pages	M-295867-03-1
	Kowite W. 2007. Production of Raw Agricultural Commodities (Seed) of Glufosinatetolerant Soybean A5547-127, USA, 2006. Bayer CropScience. Internal Report. 37pages.	M-295860-01-1

I. Caracterización del OGM.

a) Identificador único del evento de transformación, de organismos internacionales de los que México sea parte, cuando exista;

El evento de transformación A5547-127 tiene como identificador único el OECD número ACS-GM006-4, el cual en lo sucesivo también podrá ser referido como LibertyLink® por simplicidad. La soya LibertyLink® porta el gen *pat* aislado del microorganismo del suelo *Streptomyces viridochromogenes*.

La expresión de este gen lleva a la producción de la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que metaboliza el glufosinato a un derivado acetilado, inactivo, confiriendo por lo tanto tolerancia a los herbicidas en base a glufosinato de amonio (Freyssinet, 2002a M-208497-01-1).

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

Se conoce que la soya fue denominada primeramente como *Phaseolus max* L. bajo la clasificación de Carlos Linneo. Sin embargo, es el nombre de *Glycine max* (L.) Merrill., dado por Merrill en 1917, el cual es el nombre válido para esta planta.

Por otra parte, *Glycine soya* crece en forma silvestre en China, Japón, Corea, Taiwan y Rusia. *G. soya* es el ancestro silvestre de la soya. En la actualidad, el subgénero Glycine consiste en al menos 16 especies silvestres perennes: por ejemplo, *Glycine canescens,* y *G. tomentella hayata* que se encuentra en Australia y Papúa Nueva Guinea (OECD, 1993 M-254383-01-1 y 2000 M-201734-02-1).

La soya podría haber sido introducida a México en 1585 por mercaderes chinos. Sin embargo, su primer cultivo podría haber tenido lugar en 1911. No es sino hasta 1960 cuando su cultivo comenzó en forma más extensiva.

Se efectuó una revisión sobre la distribución de la soya *Glycine max* (L.) Merrill en México, la cual se complementó mediante la investigación del material conservado en el "Herbario Nacional, MEXU" del Instituto de Biología de la UNAM. Y no se encuentran reportes de poblaciones encontradas o establecidas.

Por otro lado, se realizó una consulta a la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad: (http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remibnodosdb.html?), donde se obtuvo la información de una serie de colectas que sólo indican su presencia como planta cultivada en lotes experimentales y/o comerciales con dos ejemplares reportados en: Veracruz (Xalapa) y en Tabasco (Paraíso).

Dada la nula presencia natural reportada por estas bases de datos consultadas, no se elabora aquí ningún mapa de distribución natural en México. Siendo entonces que la soya crece sólo bajo cultivo, la siembra de soya en México durante 2011 cubrió una superficie de 167 mil hectáreas que en total dieron una producción de 205 mil toneladas, siendo Tamaulipas y San Luis Potosí los estados que produjeron el 65% de este total. Otros estados, listados a continuación en forma descendente conforme a su producción son: como Campeche, Chiapas, Veracruz, Sonora, Yucatán y Quintana Roo (SIAP, 2012).

A nivel mundial de acuerdo a la información de FAO (M-295548-04-1), actualizada a Febrero del 2013, son Brasil y Estados Unidos los países que tienen una producción similar, con una participación muy importante de Argentina (Tabla 1), y las significativas importaciones de este producto (Ver tabla 1 y 2).

Tabla 1. Principales productores de soya.

Producción * (Toneladas)	
Brazil	68 756 300
Estados Unidos	90 605 500
Argentina	52 675 500
China	15 083 204
India	12 736 000
Paraguay	7 460 440
Canadá	4 345 300
Otros	13 329 336
Total	264 991 580

Tabla 2. Principales importadores de soya.

Importaciones (Toneladas)	
China	57 005 718
Estados Unidos	445 268
México	3 772 163
Japón	3 455 633
Indonesia	1 740 505
Egipto	1 752 302
Vietnam	227 697
Turquía	1 756 065
Alemania	3 383 117
Países Bajos	3 553 436
España	3 127 079
Otros	15,441,529
Total	95 660 512

c) Especificación de la existencia de especies sexualmente compatibles

No existen especies sexualmente compatibles con la soya en las áreas de liberación propuestas conforme al polígono en anexo.

Glycine max pertenece al subgénero *Soya*, el cual también contiene *G. soya* y *G. gracilis*. *G. soya*, una especie silvestre de soya, crece en campos, junto a cercos, al lado de caminos y riberas en muchos países asiáticos. Las especies silvestres de soya son endémicas en China, Korea, Japón, Taiwan y la ex Unión Soviética.

No se han observado híbridos naturales entre los sub-géneros de *Glycine* (Hymowitz 1970 M-261917-01-1). La evidencia histórica y geográfica sugiere que la soya fue primero domesticada en el este de China, entre los siglos 17 y 11 a.C.

Evidencia citológica, morfológica y molecular sugiere que *G. soya* es el ancestro de *G. max*. *Glycine gracilis* es considerado una forma de maleza o una forma semi-silvestre de *G. max*, con algunas características fenotípicas intermedias entre *G. max* y *G. soya*.

d) Descripción de los hábitats donde el OGM puede persistir o proliferar en el ambiente de liberación.

Glycine max no se encuentra como una especie silvestre (OECD, 2000, M-201734-02-1). Sin embargo, la soya se cultiva comercialmente en más de 35 países de todo el mundo, siendo los principales productores Estados Unidos, China, Corea, Argentina y Brasil.

La soya está adaptada a las regiones agrícolas desde el ecuador hasta las zonas templadas. Crece más rápidamente cuando la temperatura del aire está entre 25 y 30°C. Es una planta que florece prontamente bajo días cortos y por ello el fotoperiodo y la temperatura son factores importantes en la determinación de las áreas de adaptación del cultivo.

Los cultivares de soya se identifican en base a bandas de adaptación que corren este-oeste, determinados por la latitud y el largo del día. En América del Norte, hay trece grupos de madurez (GM), desde GM 000 en el norte (latitud 45°) hasta GM X cerca del ecuador. Dentro de cada grupo de madurez, los cultivares se describen como de maduración temprana, media o larga. La soya como cualquier otro cultivo requiere de la intervención del hombre para poder persistir.

La semilla germina cuando la temperatura del suelo alcanza los 10°C y emerge en un período de 5-7 días bajo condiciones favorables. En áreas nuevas de producción de soya, es necesario realizar una inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*, para una óptima eficiencia del sistema de nodulación de la raíz.

Glycine max pertenece al subgénero *Soya*, el cual también contiene *G. gracilis* y *G. soya*. Es ésta, la especie silvestre de soya *G. soya*, que crece en campos, junto a cercos, al lado de caminos y riberas en muchos países Asiáticos. Las especies silvestres de soya son endémicas en China, Korea, Japón, Taiwan y la ex Unión Soviética.

Los nuevos rasgos incorporados en la soya LibertyLink® que le confieren tolerancia al herbicida Glufosinato de amonio, no la hacen diferente a su contraparte convencional aparte de la ventaja de tolerar la aplicación del herbicida ya mencionado, por lo que podría persistir en el mismo hábitat que su contraparte convencional. Como ya se ha mencionado, la temperatura, la latitud, la elevación e inoculación son factores

dominantes que influencian el desarrollo de este cultivo de la misma forma que lo hacen con el cultivo convencional.

e) Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética;

Organismo receptor

Nombre científico: *Glycine max* L.

Familia: Fabaceae

Género: *Glycine*

Especie: G. *max* (2n=40)

Cultivar: Varias variedades y líneas de mejoramiento

Nombre común: Soya

Organismo donador

La soya LibertyLink® fue generada por medio del evento de transformación A5547-127 que contiene al gen *pat*, el cual proviene de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*. Esta es una bacteria gram positiva, aeróbica, esporulante que se encuentra presente en el suelo y pertenece a la familia Streptomycetae. No se conoce que *S. viridochromogenes* sea un patógeno para el hombre o haya sido asociada con otras propiedades conocidas por afectar la salud.

Especie:	*Streptomyces viridochromogenes*
Género:	Streptomyces
Familia:	Actinobacteriadae
Orden:	Actinomycetales
Subclase:	Streptomycinae
Clase:	Streptomycetaceae

f) País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido;

Bayer CropScience ha trabajado en su Área de Seeds and Traits para el desarrollo y comercialización de nuevas variedades de soya tolerantes a los herbicidas a base de glufosinato de amonio.

Desarrollado en: Agracetus, Inc. Middleton, Winsconsin. USA.

Responsable: Chuck Hansen. USA. Tel. 515-677-2605; 515-201-8847

g) Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor;

Glycine max pertenece al subgénero *Soya*, el cual también contiene *G. gracilis* y *G. soya*. Es ésta, la especie silvestre de soya *G. soya*, que crece en campos, junto a cercos, al lado de caminos y riberas en muchos países Asiáticos. Las especies silvestres de soya son endémicas en China, Korea, Japón, Taiwan y la ex Unión Soviética.

Evidencia citológica, morfológica y molecular sugiere que *G. soya* es el ancestro de *G. max*. *Glycine gracilis* es considerado una forma de maleza o una forma semi-silvestre de *G. max*, con algunas características fenotípicas intermedias entre *G. max* y *G. soya*.

No se han observado híbridos naturales entre los sub-géneros de *Glycine* (Hymowitz 1970 M-261917-01-1). La evidencia histórica y geográfica sugiere que la soya fue primero domesticada en el este de China, entre los siglos 17 y 11 a.C.

Glycine max no se encuentra como una especie silvestre (OECD, 2000, M-201734-02-1). Actualmente la soya se cultiva comercialmente en más de 35 países de todo el mundo, siendo los principales productores Estados Unidos, China, Corea, Argentina y Brasil.

La soya está adaptada a las regiones agrícolas desde el ecuador hasta las zonas templadas. Crece más rápidamente cuando la temperatura del aire está entre 25 y 30°C. Es una planta que florece más prontamente bajo días cortos y debido a esto el foto-periodo y la temperatura son factores importantes en la determinación de las áreas de adaptación del cultivo.

Los cultivares de soya se identifican en base a bandas de adaptación que corren este-oeste, determinados por la latitud y el largo del día. En América del Norte, hay trece grupos de madurez (GM), desde GM 000 en el norte (latitud 45°) hasta GM X cerca del ecuador. Dentro de cada grupo de madurez, los cultivares se describen como de maduración temprana, media o larga.

La semilla germina cuando la temperatura del suelo alcanza los 10°C y emerge en un período de 5-7 días bajo condiciones favorables. En áreas nuevas de producción de soya, es necesario realizar una inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*, para una óptima eficiencia del sistema de nodulación de la raíz.

La soya es cultivada principalmente para la producción de semilla, ya que la misma tiene una multitud de usos en los sectores alimenticios e industriales y representa una de las principales fuentes de aceite vegetal comestible y proteínas para uso como alimento para el ganado.

h) Secuencia génica detallada del evento de transformación, incluyendo tamaño del fragmento insertado, sitio de inserción de la construcción genética, incluyendo las secuencias de los oligonucleótidos que permitan la amplificación del sitio de inserción.

El gen pat introducido dentro del evento de soya A5547-127 proviene de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*. Esta es una bacteria gram positiva, aeróbica, esporulante que se encuentra presente en el suelo y pertenece a la familia Streptomycetae. No se conoce *que S. viridochromogenes* sea un patógeno para el hombre o haya sido asociada con otras propiedades conocidas por afectar la salud.

S. viridochromogenes posee un alto contenido C+G en su genoma, situación que se ve reflejada en la secuencia del gen *pat* y que no es común en plantas. En función de esta diferencia y para optimizar el uso de codones del gen se generó una secuencia sintética de nucleótidos modificada utilizando codones típicos para plantas (De Beuckeleer M. 2004a M-228121-01-1).

La secuencia de ADN que precedía el codón de iniciación ATG fue levemente modificada, ya que se le removió el sitio SalI. Esta modificación no tiene efecto en la secuencia de aminoácidos resultante de la proteína PAT **INFORMACION CONFIDENCIAL.**

El mecanismo molecular por el cual el gen introducido expresa el fenotipo es en base a que la característica introducida en el evento de soya A5547-127 es la expresión estable y constitutiva de la proteína PAT, que le confiere a la planta de soya LibertyLink tolerancia al herbicida Glufosinato de Amonio. A continuación se describe el mecanismo por el cual esta modificación resulta en el fenotipo de tolerancia.

La secuencia de ADN insertada en el evento de soya A5547-127 **INFORMACION CONFIDENCIAL.**

La enzima Glutamino Sintetasa (GS) juega un rol central en el metabolismo de nitrógeno de las plantas superiores donde es la única enzima en plantas que puede detoxificar el amoníaco liberado por la reducción de nitrato, degradación de aminoácidos y fotorespiración. El amoníaco, aun tratándose de un nutriente vegetal es tóxico si se encuentra en exceso y ocasiona la muerte de la célula vegetal.

L-fosfinotricina es un potente inhibidor de la enzima Glutamino Sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une competitivamente a la enzima desplazando al L-glutamato del sitio activo.

Si bien la GS de *S. viridochromogenes* es sensible a L-fosfinotricina, la bacteria produce una enzima (PAT) que la inactiva. PAT cataliza la conversión de L-fosfinotricina a N-acetil-L-fosfinotricina en presencia de acetil CoA como co-substrato. N-acetil-L-fosfinotricina no inhibe a GS, y, por lo tanto, no tiene actividad herbicida.

La enzima PAT está codificada por el gen *pat* en *S. viridochromogenes*. Este gen funciona como una parte integral de la ruta biosintética de bialaphos y confiere la tolerancia a glufosinato de amonio (Bayer *et al.*, 1972 M-117813-01-2).

i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, y los resultados de los experimentos que comprueben los datos anteriores, así como la expresión de mensajeros del evento de transformación genética, incluyendo la demostración de los resultados

El locus *pat* presente en el evento de soya A5547-127 está compuesto por una copia del casete *pat*. Esto fue demostrado por experimentos de Southern Blot y confirmado mediante la secuenciación del inserto.

La secuenciación de los fragmentos de PCR amplificados a partir del genoma del evento de soya A5547- **INFORMACION CONFIDENCIAL.**

Experimentos de Southern Blot realizados con ADN del evento de soya A5547-127, de su contraparte no genéticamente modificado. **INFORMACION CONFIDENCIAL.**

Las secuencias flanqueantes obtenidas **INFORMACION CONFIDENCIAL.**
Sobre el número de sitios de integración, al evento de soya A5547-127 se le ha integrado en su genoma un único inserto.

La determinación del número de insertos presentes en el evento de soya A5547-127 fue realizada mediante un análisis de Southern Blot utilizando como control ADN genómico de su línea parental no genéticamente modificada A5547.

Las muestras de ADN genómico de ambos grupos de plantas fueron digeridas independientemente. **INFORMACION CONFIDENCIAL.**

j) Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres producto de los genes insertados, expresión de las proteínas y localización de las mismas;

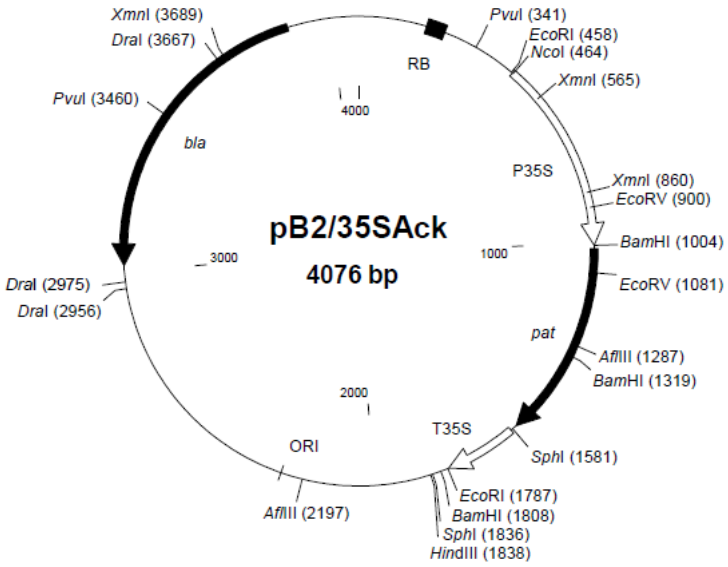


Figura 3. Mapa del vector pB2/35SAcK conteniendo los sitios de restricción (Moens, 2012, M-143015-04-2).

Tabla 7. Características del producto de expresión

Elemento genético	***pat***
Producto de expresión	Proteína PAT (fosfinotricina acetil transferasa)
Caracterización molecular detallada del producto	Peso Molecular: 21 kDa; Número de aa:183
Secuencia aminoácidos	Se detalla a continuación de la tabla
Actividad biológica en el OVGM indicando función específica y mecanismo molecular detallado de su actividad	La proteína PAT confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.
Tejido / órgano	Se expresa de manera constitutiva en toda la planta
Nivel de expresión y evolución temporal en relación con el ciclo de la planta	Ver a continuación

La expresión de la proteína PAT fue evaluada en raíces, tallo, hojas y semillas provenientes de ensayos en invernáculo y a campo. Todas las determinaciones fueron realizadas mediante la técnica de ELISA (De Wulf y De Pestel, 2007, M-293325-01-1).

Para el caso de raíces, tallo y hojas las muestras fueron tomadas a partir de plantas cultivadas en invernáculo y asperjadas con glufosinato de amonio previo a la toma de muestra. Los contenidos promedio en cada tejido y para cada estado de desarrollo se muestran en la Tabla 8 y en la figura 4.

Tabla 8. Contenido de PAT en raíces, tallos y hojas

Tejido	Contenido promedio de PAT (µg/g) + SD		Proteínas totales Extraíbles (TEP) % de peso fresco		Contenido promedio de PAT como % de TEP	
	V_3	V_8	V_3	V_8	V_3	V_8
Hoja	18.40 ± 6.50	26.22 ± 9.87	8.43 ± 1.40	3.65 ± 1.12	0.22	0.73
Tallo	39.18 ± 3.04	13.85 ± 6.12	4.75 ± 0.35	1.84 ± 1.05	0.83	0.84
Raíz	8.16 ± 2.50	3.60 ± 0.42	2.53 ± 0.40	1.20 ± 0.38	0.32	0.32

No se detectó la presencia de PAT en muestras provenientes de plantas no genéticamente modificadas (A5547).

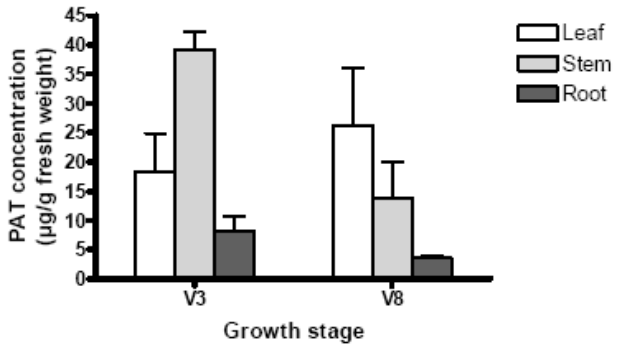


Figura 4. Contenido de PAT en los diferentes tejidos en estadios V3 y V8

Como puede observarse, el contenido de PAT en los tejidos se encuentra dentro del mismo orden de magnitud y siempre por debajo del 0,8% de las proteínas totales extraíbles de la muestra.

El contenido de PAT también fue cuantificado en semillas provenientes del evento de soya A5547-127 (Shillito, 2003, M-238895-01-1). Para esto se consideraron muestras de semillas provenientes de plantas del evento de soya A5547-127 y de su contraparte no genéticamente modificada (A5547) cultivadas a campo en la región de Florida en el año 1999. La semilla utilizada para este ensayo proviene de 9 lotes:

3 parcelas de plantas A5547 (no transgénicas)

3 parcelas del evento A5547-127

3 parcelas del evento A5547-127 asperjado con glufosinato de amonio (GA 0.35 lb ai/acre).

Los resultados obtenidos (Tabla 9) demuestran que los contenidos de PAT en la semilla son extremadamente bajos.

Tabla 9. Contenido de PAT en la semilla del evento de soya A5547-127

PAT (µg/g peso fresco) ± SD		% proteínas totales		PAT % crude protein	
Asperjado con GA	Sin asperjar	Asperjado con GA	Sin asperjar	Asperjado con GA	Sin asperjar
0.017471	0.020202	36.5	38.8	0.0048	0.0056

No fue detectada la presencia de PAT en semillas provenientes de plantas no genéticamente modificadas.

k) Descripción del método de transformación;

El método de transformación empleado para la generación del evento de soya A5547-127 fue biobalística. El ADN utilizado para el bombardeo proviene de la digestión con la enzima *PvuI* del plásmido pB2/35SAcK.

El tejido utilizado para la transformación se obtuvo a partir de ápices de brotes derivados de semillas de soya esterilizadas en superficie. La preparación y el delivery del ADN (bombardeo de partículas) fue realizado siguiendo los métodos en Christou *et al.*, (1988 M-204364-01-1). No se utilizó ningún carrier de ADN en el proceso.

La formación de brotes de novo fue inducida en un medio conteniendo citoquinina, y los brotes transgénicos jóvenes que incorporaron el ADN y expresaban el fenotipo codificado fueron detectados rociando el cultivo con glufosinato de amonio. Estos brotes luego

fueron luego transferidos a invernadero para su evaluación. Las plántulas sobrevivientes crecieron hasta florecer y producir semilla.

El transformante original (R0) se obtuvo en diciembre 1995. En Junio 1995 se plantó la primera semilla R1.

El vector utilizado para la obtención del evento de soya A5547-127 fue denominado pB2/35SAcK y deriva del plásmido pUC19. En él se insertaron el borde derecho (RB) del plásmido pTiAch5 de *Agrobacterium tumefaciens* y el gen *pat* fusionado al promotor y terminador 35S provenientes ambos del virus del mosaico de la coliflor (Moens_2012_ M-143015-04-2).

La construcción del vector de transformación pB2/35SAcK se basó en la inserción del borde derecho (RB) del plásmido pTiAch5 de *Agrobacterium tumefaciens* y el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* en el plásmido pUC19. La expresión del gen *pat* está regulada en la planta mediante su fusión al promotor y terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (Moens_2012_ M-143015-04-2).

Para la construcción se sintetizó un fragmento de ADN correspondiente al RB introduciendo un sitio de corte de la enzima NdeI en cada uno de sus extremos y se lo clonó en el sitio N deI del plásmido pUC19, resultando en el plásmido pUC19RB2.

Dado que las bacterias del género *Streptomyces* poseen un alto contenido de G+C se sintetizó una variante del gen *pat* que optimiza su uso de codones para plantas sin alterar la secuencia de aminoácidos resultante (De Beuckeleer, 2004a, M-228121-01-1) y se lo clonó en el sitio *EcoRI* del plásmido pUC19RB2, obteniendo el plásmido pB2/35SAcK. Las secuencias que preceden el sitio de inicio de la traducción (ATG) fueron levemente modificadas por la remoción de un sitio de restricción *SalI*, sin modificar la secuencia codificante de *pat* (De Beuckeleer, 2004b, M-135134-03).

El plásmido pUC19 que sirve de esqueleto al pB2/35SAcK incluye el origen de replicación bacteriano (ori) y el gen de resistencia a ampicilina (*bla*). Para evitar que estos sean funcionales una vez integrado el inserto en el genoma de la planta se digirió el plásmido con la enzima *PvuI* antes de la transformación, esto interrumpe la secuencia codificante del gen de resistencia a ampicilina.

La siguiente Tabla 10 de forma descriptiva se muestran todos los elementos incluidos en la construcción (o construcciones) utilizada para la transformación:

Tabla 10. Elementos Genéticos del Plásmido pB2/35SAcK

Posición en Vector	Elemento Genético	Función
0001-0188	Secuencia del Vector pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)	Estructura del Vector
0189-0243	**RB: Borde Derecho** fragmento del plásmido octopina TiAch5 (Gielen *et al.*, 1984)	Elemento actuando en *Cis* para la transferencia de ADN-T
0244-0460	Secuencia del Vector pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)	Estructura del Vector
0461-1003	**P35S: promotor** del virus en Mosaico de la Coliflor del vector PDH51 (Pietrzak *et al.*, 1986)	Promotor de la transcripción (constitutiva fuerte)
1004-1011	Secuencias sintéticas derivadas de sitio de múltiple clonado	Sitio de clonado del plásmido
1012-1563	***pat:*** gen *pat* sintético (secuencia de aminoácidos de *Streptomyces viridochromogenes*) (Strauch *et al.*, 1993)	Tolerancia a Herbicida y marcador de selección
1564-1581	Secuencias sintéticas derivadas de sitio de múltiple clonado	Sitio de clonado del plásmido
1582-1784	**T35S: terminador** del virus en Mosaico de la Coliflor del vector PDH51 (Pietrzak *et al.*, 1986)	Señal de stop
1785-4076	Secuencia del vector pUC19, incluyendo el sitio de múltiple clonado (pos. 185-1843), el **ori** (origen de replicación) en posición 2257 y el gen ***β-lactamasa* (*bla*)** (pos. 3876-3016) (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)	Origen de replicación bacteriana y marcador bacteriano

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 los efectos no esperados

Además de las secuencias reguladoras que confieren la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, no se encuentra alguna otra secuencia incluida en el casete de expresión. El evento de transformación A5547-127 de soya LibertyLink tiene como único producto de expresión la proteína PAT, codificada por el gen homónimo. No existen en la construcción genética introducida genes acompañantes que resulten en la expresión de nuevas proteínas.

Dado que la expresión de PAT lleva a la tolerancia a glufosinato de amonio se utilizó este atributo como marcador de selección durante el proceso de transformación y la selección de las líneas.

La caracterización molecular del evento A5547-127 por medio de experimentos de Southern Blot (Moens 2012 M-142853-01-1) confirman la presencia de en un inserto único que se hereda como un locus dominante simple.

La secuenciación del inserto (Berghman S.y De Beuckeleer M. 2002a, M-199536-03-1) junto con la interpretación de los experimentos de Southern Blot demuestran que el inserto consta de una copia del casete de expresión del gen pat flanqueadas por dos fragmentos no funcionales del gen β-lactamasa (bla) cuya ausencia de expresión fue determinada por la digestión del plásmido con la enzima *PvuI* previo a la transformación, predicha por la secuencia de inserto y confirmada por experimentos.

m) Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas por el OGM, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples.

INFORMACION CONFIDENCIAL.

n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios

La característica introducida es la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Dicha característica se basa en la introducción del gen *pat* aislado del microorganismo del suelo *Streptomyces viridochromogenes*.

La expresión de este gen lleva a la producción de la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que metaboliza el glufosinato a un derivado acetilado, inactivo, confiriendo por lo tanto tolerancia a los herbicidas en base a glufosinato de amonio (Freyssinet, 2002a, M-208497-01-1).

Es sólo con la aplicación del herbicida glufosinato de amonio (GA), un potente inhibidor de la glutamino sintetasa (GS), una enzima que juega un papel esencial en la asimilación de amonio y en la regulación del metabolismo del nitrógeno en la planta, que la expresión del transgen se ve involucrada en una ruta metabólica. El producto del gen *bar*

metaboliza al GA a un derivado acetilado inactivo. Las plantas que no tienen el transgen pueden ser reconocidas y destruidas usando el herbicida en un estado temprano del desarrollo de la planta. (Freyssinet, 2002a, M-208497-01-1)

Por otro lado, el análisis del comportamiento agronómico de la soya comparado con su contraparte convencional durante dos años muestra que no hubo influencia por la modificación genética.

o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos.

El gen insertado en el genoma del evento de soya A5547-127 (*pat*) es originario de *S. viridochromogenes*. Esta es una bacteria ubicua en el suelo de la que no se han reportado efectos patógenos ni se la ha asociado con la producción de alérgenos o toxinas.

En numerosas ocasiones una respuesta de tipo alérgica es desencadenada por compuestos biológicos de alto peso molecular (mediadas por IgE) o compuestos químicos de bajo peso molecular (no mediadas por IgE). La proteína PAT no tiene características que puedan asociarse a ningunos de estos 2 grupos.

Es conocido que los alérgenos poseen una relativa estabilidad frente al calor. Esto es debido a la conservación de las secuencias lineales que forman los epítopes reconocidos por las inmunoglobulinas del tipo E (IgE). Este fenómeno refuerza la importancia de las búsquedas de homologías en ventanas limitadas (8 aminoácidos) que permitan identificar epítopes.

Si bien PAT es detectable en geles de poliacrilamida luego de una incubación por 30 min a 90ºC (Rascle 2009a, M-131221-04-1) es importante destacar que no presenta homología con alérgenos conocidos ya sea en una búsqueda amplia o limitada a la identificación de epítopes.

Sobre su digestión en jugo gástrico simulado, la estabilidad de la proteína PAT fue investigada en el fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF) simulados siguiendo los métodos

recomendados por "International Life Sciences Institute" (ILSI). Los resultados obtenidos muestran que PAT es degradada dentro de los 30 segundos en SGF conteniendo pepsina a pH 2,0 (Rascle 2009b, M-214025-04-1).

Para la determinación de la estabilidad de PAT en SIF se acopló un ensayo de Western Blot y se observó que los niveles de PAT caen por debajo del 10% en los primeros 5 minutos de incubación y son indetectables luego de 10 minutos (Rascle 2009c, M-214021-03-1).

Estos resultados demuestran que la estabilidad de PAT bajo las condiciones que debe enfrentar en el sistema gastrointestinal es extremadamente baja y confirman que su ingesta como parte del alimento no representa riesgo potencial ya que su rápida degradación minimiza la posibilidad de que pueda disparar algún efecto tóxico o alergénico.

Sobre toxicidad, habiéndose demostrado la equivalencia sustancial entre el evento de soya A5547-127 y cualquier variedad de soya se presenta como única diferencia entre ambas la presencia del producto de expresión de la modificación genética: la proteína PAT. Los estudios biológicos, bioquímicos y bioinformáticos realizados demuestran que esta proteína no es tóxica para humanos o animales.

PAT pertenece al grupo de las acetil transferasas y es similar en cuanto a su estructura bidimensional, inmunoreactividad, peso molecular y propiedades funcionales con otras acetil transferasas comunes en plantas y animales que forman parte de la dieta humana y animal y su presencia en los alimentos no representa una nueva exposición. Cabe destacar que no existen reportes que indiquen que esta clase de enzimas sea potencialmente tóxica o alergénica.

En cualquier caso, se realizaron una serie de ensayos biológicos y bioinformáticos cuyos resultados se resumen a continuación: PAT no comparte homología de secuencia con toxinas o alérgenos conocidos y no es estable en las condiciones que debe afrontar en el tubo digestivo. Más aún, no demostró toxicidad cuando fue inyectada por vía intravenosa en ratones. Una demostración detallada de la ausencia del carácter tóxico de PAT puede encontrarse en (Hérouet *et al.*, 2005, M-247779-01-1).

p) Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras incluyendo promotores, terminadores y otras, y su descripción, número de copias insertadas, pertenencia de éstas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora. **INFORMACION CONFIDENCIAL.**

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

La secuencia de aminoácidos de la proteína PAT no muestra evidencias de ningún potencial tóxico o alergénico.

La secuencia de aminoácidos de la proteína PAT codificada por el gen *pat* sintético ha sido completamente analizada por métodos bioinformáticos siendo completamente idéntica a la proteína nativa de *Streptomyces viridochromogenes* (Capt 2012, M-266573-05-1).

La búsqueda de homologías de la enzima PAT (siguiendo las recomendaciones de FAO/WHO) no mostró similitud con toxinas y alérgenos conocidos (Capt 2012, M-266573-05-1). PAT posee similitud sólo con otras enzimas de actividad acetil transferasas sobre las que no se han reportado características tóxicas o alergénicas. Tampoco se encontró homología utilizando una ventana de 8 aminoácidos (con 100% de identidad dentro de la ventana) con epitopes de alérgenos conocidos (Capt 2012b, M-217013-06-1) ni sitios putativos de glicosilación.

Se realizó un análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína PAT con el objetivo de identificar secuencias consenso asociadas a sitios de glicosilación. Los resultados obtenidos muestran que no existen en PAT sitios putativos de glicosilación (Capt 2012, M-217013-06-1 y Capt 2007a, M-142779-04-1).

S. viridochromogenes es una bacteria ubicua en el suelo de la que no se han reportado efectos patógenos ni se la ha asociado con la producción de alérgenos o toxinas.

Por el contrario, y a pesar de su gran difusión como alimento, se han identificado en la soya algunos compuestos con efectos antinutrientes. La modificación genética presente

en el evento de soya A5547-127 no modifica el nivel de expresión de estos compuestos cuyas características se señalan a continuación:

Inhibidores de proteasas: Se conocen 2 tipos de inhibidores de proteasas en semillas de soya. Son el inhibidor de Kunitz y el inhibidor de Bowman-Birk. Ambos son activos contra la tripsina y el inhibidor de Bowman-Birk también es activo contra la quimotripsina (Liener, 1994, M-204382-01-1). Estos inhibidores de tripsina interfieren con la digestión de proteínas dando como resultado una inhibición del crecimiento. Se ha informado actividad de inhibición de tripsina de 100 a 184 Unidades de Tripsina Inhibidas (UTI)/mg de proteína (Kakade et al., 1972, M-183138-01-1). La actividad de inhibición de tripsina se destruye cuando los alimentos a base de soya son cocidos en los sistemas de procesamiento.

Lectinas: Las lectinas se unen a moléculas que contienen carbohidratos. La lectina presente en soya cruda puede inhibir el crecimiento o causar la muerte a animales y presumiblemente puede tener el mismo efecto en el hombre (Liener, 1994, M-204382-01-1). La habilidad de las lectinas de actuar como hemoaglutinantes es la base de la mayoría de los métodos de cuantificación. La lectina de soya es a veces mencionada como soya hemoaglutinante. Los niveles de lectina pueden variar de 37 a 323 Unidades con Actividad Hemoaglutinante (HU)/mg de proteína (Kakade *et al.*, 1972, M-183138-01-1). En un estudio, los niveles de lectina cayeron aproximadamente 100-ordenes de 2,6 HU/mg de proteína total en semilla cruda a menos de 0.05 HU/mg de proteína total en alimentos de soya desgrasados y tostados (Oberdoerfer_2012_M-360323-02-1).

Fitoestrógenos: La soya contiene naturalmente un número de compuestos isoflavonoides sobre los cuales se ha informado que poseen actividades bioquímicas en especies de mamíferos, incluyendo actividades estrogénicas e hypocolesterolémicas. Estos compuestos han sido implicados en efectos adversos en sistemas reproductivos en animales alimentados con dietas que contenían grandes cantidades de soya (Schutt, 1976, M-204367-01-1). No está aceptado universalmente que estos isoflavonoides sean anti-nutrientes ya que también se han reportado efectos anticancerígenos (Messina y Barnes, 1991, M-204379-01-1).

Estaquiosa y Rafinosa: El bajo peso molecular de los carbohidratos estaquiosa y rafinosa hace que los mismos sean considerados anti-nutrientes debido a la producción de gas y la

flatulencia resultante causada por la ingesta de estos compuestos (Rackis, 1974, M-204371-01-1). Estos compuestos están presentes en alimentos de soya desgrasados y cocidos (Oberdoerfer_2012_M-360323-02-1) así como también en soya cruda. El contenido de estaquiosa en soya varía entre 1.2 - 3.4 g/100 g en soya cruda, y el contenido de rafinosa varía entre 0.2 - 0.4 g/100g de soya cruda (Douglass, 1996, M-143563-01-1).

Acido Fítico: El ácido fítico (myoinositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihydrogen phosphate)) se encuentra en semillas de soya. Este compuesto puede quelar nutrientes minerales incluyendo calcio, magnesio, potasio, hierro y zinc, haciéndolos nutricionalmente no disponibles (Liener, 1994, M-204382-01-1). El ácido fítico es considerado un antinutriente por esta característica de limitar la disponibilidad de nutrientes minerales. El ácido fítico se encuentra normalmente en soya y en la mayoría de los productos de soya en una cantidad de 1 a 1.5% del peso seco (Liener, 1994), sin embargo, valores mayores (hasta 2.74%) han sido reportados en la naturaleza (Douglass, 1996, M-143563-01-1).

Cuando se realiza el análisis bioinformático para la identificación de la homología de las nuevas proteínas con proteínas de actividad tóxica conocida, la búsqueda de homologías de la enzima PAT (siguiendo las recomendaciones de FAO/WHO) no mostró similitud con toxinas y alérgenos conocidos (Hérouet *et al.*, 2005, M-247779-02-1, Capt 2012 M-266573-05-1, Capt 2012, M-217013-06-1.). PAT posee similitud sólo con otras enzimas de actividad acetil transferasas de las que no se han reportado características tóxicas o alergénicas. Tampoco se encontró homología utilizando una ventana de 8 aminoácidos (con 100% de identidad dentro de la ventana) con epitopes de alérgenos conocidos (Hérouet et al., 2005, M-247779-01-1, Capt 2012, M-217013-06-1.) ni sitios putativos de glicosilación.

Respecto a los ensayos de toxicología subcrónica o crónica de la nueva proteína, la proteína PAT no tiene antecedentes que sugieran posibles efectos tóxicos ni homología con proteínas tóxicas o alergénicas. Más aún, no demostró toxicidad cuando fue dosificada por la vía intravenosa en animales de experimentación. Completando estos resultados, pudo observarse que es rápidamente degradada en fluido gástrico o intestinal simulado. Estos resultados hacen que un estudio de toxicidad subcrónica no sea necesario.

En la evaluación de toxicología subcrónica o crónica del alimento completo, la existencia de completa equivalencia desde el punto de vista sustancial y nutricional entre el evento de soya LibertyLink A5547-127 y su contraparte no genéticamente modificada sumada a la ausencia de evidencias que indiquen potenciales efectos tóxicos o alergénicos de la proteína PAT eximen de la necesidad de realizar este tipo de estudios.

Respecto a pruebas de efectos carcinogénicos y teratológicos a corto y mediano plazo, no se consideró necesario realizar este tipo de ensayos, dado que el evento de soya LiberyLink es sustancialmente equivalente a su línea de origen (A5547) y a las variedades de soya tomadas como referencia por la literatura y que su comportamiento agronómico y funcional como alimento son similares a éstas.

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

La característica introducida en el evento de soya A5547-127 es la expresión estable y constitutiva de la proteína PAT, que le confiere a la planta de soya tolerancia al herbicida Glufosinato de Amonio. A continuación se describe el mecanismo por el cual esta modificación resulta en el fenotipo de tolerancia.

La enzima Glutamino Sintetasa (GS) juega un rol central en el metabolismo de nitrógeno de las plantas superiores donde es la única enzima en plantas que puede detoxificar el amoníaco liberado por la reducción de nitrato, degradación de aminoácidos y fotorespiración. El amoníaco, aun siendo un nutriente vegetal y un metabolito, es tóxico en exceso y lleva a la muerte de la célula vegetal.

L-fosfinotricina es un potente inhibidor de la enzima Glutamino Sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une competitivamente a la enzima desplazando al L-glutamato del sitio activo.

Si bien la GS de *S. viridochromogenes* es sensible a L-fosfinotricina, la bacteria produce una enzima (PAT) que la inactiva. PAT cataliza la conversión de L-fosfinotricina a N-acetil-L-fosfinotricina en presencia de acetil CoA como co-substrato. N-acetil-L-fosfinotricina no inhibe a GS, y, por lo tanto, no tiene actividad herbicida.

La enzima PAT está codificada por el gen pat en S. *viridochromogenes*. Este gen funciona como una parte integral de la ruta biosintética de bialaphos y confiere la tolerancia a glufosinato de amonio (Bayer et al., 1972 M-117813-01-2).

s) Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgen.

La transferencia del inserto presente en el evento de soya A5547-127 y su patrón de segregación fue verificada hasta las generaciones R2 y R3 (Van Wert, 2009, M-181487-03-1).

Para lograr estás líneas se autopolinizaron las transformantes originales (R0) obteniendo plantas R1 sensibles y tolerantes a glufosinato de amonio. Las plantas tolerantes fueron nuevamente autopolinizadas para obtener la generación R2.

Es de esperar que si las plantas presentan homocigocis respecto del locus *pat* toda su progenie sea tolerante al herbicida, y que si la planta es heterocigota, su progenie guarde una relación tolerante: sensible de 3:1.

Entonces, si el locus *pat* se hereda establemente, toda la progenie de una planta homocigota debería presentar tolerancia al herbicida. Esto fue evaluado durante tres generaciones consecutivas y se corroboró para todas las plantas homocigotas analizadas.

Los estudios realizados con plantas hemicigotas y el análisis molecular realizado hasta la generación R5 confirman y refuerzan estas conclusiones.

Para caracterizar el patrón de segregación del evento de soya A5547-127 se obtuvo la progenie de plantas homocigotas y heterocigotas. Los resultados mostraron que toda la progenie de plantas homocigotas tiene tolerancia a glufosinato de amonio.

Cuando se autopolinizaron la plantas R0 tolerantes a glufosinato de amonio se obtuvieron hileras completamente tolerantes al herbicida e hileras con tolerancia parcial o nula en una proporción 1:2 (Tabla 12). Es de suponer que la tolerancia parcial se deba a la hemicigosis para el locus *pat*.

La autopolinización de las plantas R1 con tolerancia parcial (presumiblemente hemicigotas) dieron como resultado plantas R2 tolerantes en una proporción 3:1 con respecto a las plantas sensibles.

Estos resultados demuestran que el inserto presente en el evento de soya A5547-127 (locus *pat*) se hereda como un locus mendeliano dominante simple (Van Wert, 2009, M-181487-03-1).

Tabla 12. Patrón de segregación del locus *pat* del evento de soya A5547-127

Comparación	Progenie	Plantas resistentes	Plantas sensitivas	Radio esperado	Original X2	Verified X2
Hilera 1	R3	66	16	3:1	1.52	1.32
Hilera 2	R3	141	36	3:1	1.97	2.05
Hilera 3	R3	35	7	3:1	1.84	1.56
Hilera 4	R3	50	11	3:1	1.46	1.58
Hilera 7	R3	40	7	3:1	2.72	2.56
Hilera 9	R3	73	13	3:1	4.8	4.48
Hilera 10	R3	43	8	3:1	2.51	2.36
Hilera 11	R3	34	6	3:1	2.13	2.13
Hilera 13	R3	34	8	3:1	1.02	0.79
Hilera 14	R3	32	3	3:1	5.26	5.04
Hilera 16	R3	41	10	3:1	0.89	0.79
Hilera 17	R3	36	10	3:1	0.4	0.26
Hilera 21	R3	76	21	3:1	0.52	0.58
Hilera 22	R3	47	8	3:1	3.37	3.21
Hilera 23	R3	120	31	3:1	1.69	1.61
Hilera 25	R3	141	22	3:1	11.68	11.50
Hilera 26	R3	143	53	3:1	0.44	0.44
Hilera 27	R3	80	16	3:1	3.56	3.56
Hilera 29	R3	119	25	3:1	4.48	4.48
Hilera 30	R3	148	46	3:1	0.23	0.17
Hilera 31	R3	34	8	3:1	1.02	0.79

Nota: Los valores que difieren con los valores verificados están subrayados y así los valores verificados corregidos ya son mostrados en la última columna.

La estabilidad del locus *pat* en el evento de soya A5547-127 fue demostrada por medio de experimentos de Southern Blot en tres generaciones consecutivas. La sonda utilizada para detectar la presencia del inserto en las distintas muestras corresponde al fragmento *EcoRI* del plásmido pB2/35SAcK (Figura 5) (De Beuckeleer 1998, M-183196-01-1).

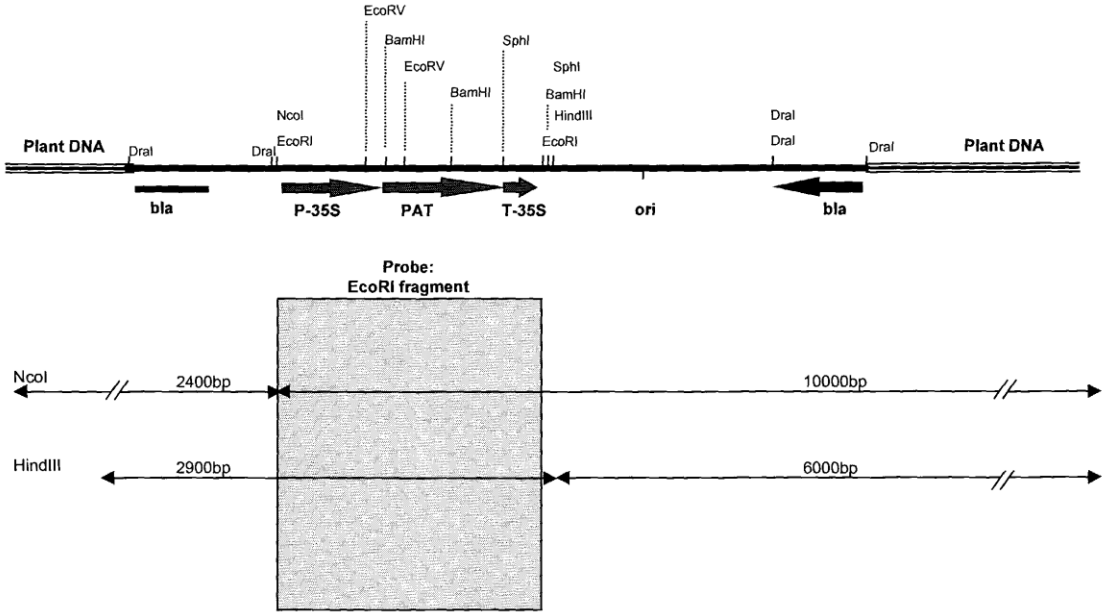


Figura 5. Zona de hibridación de la sonda utilizada para la demostración de la estabilidad del evento.

Los resultados obtenidos para las generaciones R3 a R5 se muestran en la Figura 6.

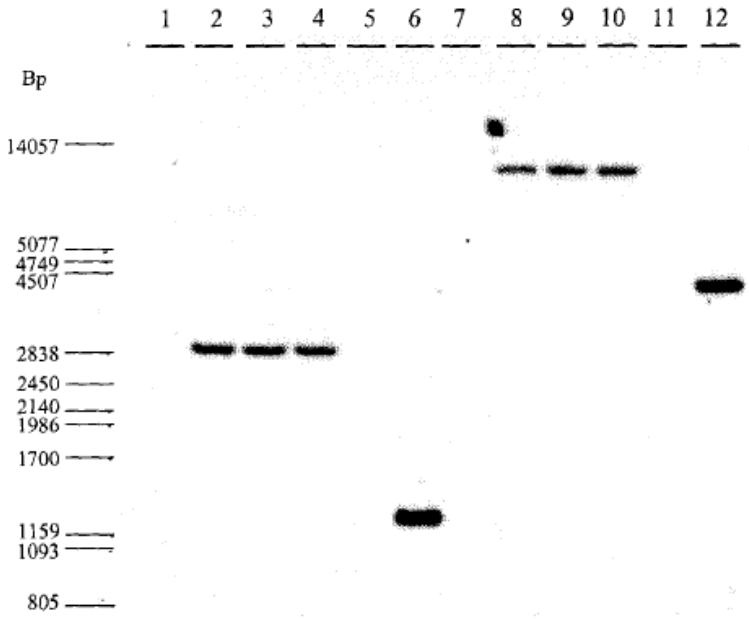


Figura 6. Estabilidad del inserto en generaciones sucesivas
10 µg de ADN genómico de hojas del evento de soya A5547-127 (generaciones R_3 a R_5) fueron digeridos con las enzimas *Nco*I o *Hind*III e hibridados con la sonda *pat* (fragmento *Eco*RI del plásmido pB2/35SAcK, 1329 pb).

1. λ ADN digerido con *Pst*I
2. A5547-127- R3 digerido con *Hind*III
3. A5547-127- R4 digerido con *Hind*III
4. A5547-127- R5 digerido con *Hind*III
5. A5547 – *Hind*III
6. A5547 silvestre digerido con *Hind*III + 1 copia de pB2/35SAcK digerido con *Eco*RI
7. Calle sin sembrar
8. A5547-127- R3 digerido con *Nco*I
9. A5547-127– R4 digerido con *Nco*I
10. A5547-127– R5 digerido con *Nco*I
11. A5547 digerido con *Nco*I
12. A5547 digerido con *Nco*I + 1 copia de pB2/35SAcK digerido con *Nco*I

Como se puede observar en la Figura 6, el patrón de bandas observado corresponde a lo esperado para las enzimas utilizadas en la digestión del ADN del evento, así como para el plásmido utilizado en la transformación. Este patrón se mantiene constante a lo largo de las 3 generaciones analizadas, demostrando la estabilidad del evento.

t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados

Bayer, E. et al. 1972. Phosphinothricin and phosphinotrhicyl-alanyl-alanine. Helvetica Chimica Acta, Vol. 55, Fasc 1, N° 25.	M-117813-01-2
Berghman S., De Beuckeleer M. 2002a. Determination of inserted transgenic sequences in Glycine max elite event A5547-127. Aventis CropScience N.V. Internal Report. 29 pages.	M-199536-03-1
Capt 2012b. PAT protein from pat gene - Epitope homology and N-glycosylation searches. Bayer CropScience. Internal report	M-217013-06-1
Capt A. 2012a. PAT/*pat* protein amino acid sequence homology search with known toxins. Bayer CropScience. Internal report	M-266573-05-1
Capt A. 2007a. Assessment of the toxicity and allerginicity of the PAT protein (*pat* gene). Bayer CropScience Internal Report. 63 pages.	M-142779-04-1
Christou, P. 1988. Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles. Plant Physiology 87:671-674	M-204364-01-1
De Beuckeleer M. 2002. Analysis of the nature of the flanking sequences from Glycine max event A5547-127 Bayer CropScience NV. Internal Report. 22.	M-217836-01-1
De Beuckeleer M. 2004a. Description of the base pair sequences of the pat gene. Bayer BioScience NV. Internal Report. 5 pages. #C040035	M-228121-01-1
De Beuckeleer M. 2004b _PAT. Description of the amino acid sequence of the PAT protein encoded from the pat gene. Bayer BioScience NV. Internal Report. 5 pages. #C040027	M-135134-03-1
De Beuckeleer M. 1998. Molecular Demonstration of the Stability of the Integration of Glycine max Transformation Event A5547-127 Plant Genetic Systems NV. Internal Report ID Stability Analysis. 13 pages.	M-183196-01-1
De Pestel K., Tanghe S. 2007 Bioinformatics analysis of the pre-insertion locus of Glycine max transformation event A5547-127. Bayer BioScience NV. Internal Report. 38 pages.	M-296123-01-1.
De Wulf A., De Pestel K. 2007. PAT protein contents in leaf, stem and root tissues throughout the life cycle of the glufosinate tolerant soybean event A5547-127. Bayer BioScience NV. Internal Report. 35 pages.	M-293325-01-1
Douglass, 1996.. Recommended compositional and nutritional parameters to test in soybean	M-143563-01-1
FAO. Soybean Statistics. 2013.	M-295548-04-1
Freyssinet M. 2002a. General description of the bacterial gene pat and its gene product PAT as used for producing plants with a genetically-based tolerance to Liberty® Herbicide. Bayer CropScience. Internal Report. 24 pages. #C025020	M-208497-01-1
Freyssinet M. 2002c 2002b M-208502-01-1. Agronomic performance of Glufosinate tolerant soybean Events A2704-12 and A5547-127 In the 2000 Brazil production season. Bayer CropScience. Internal Report. 14 pages. #C025022.	M-208502-01-1
Hérouet C., Esdaile, D., Mallyon, B., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis, R., Rouan, D. 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 (2005) 134-149.	M-247779-01-1
Hymowitz 1970. On the domestication of the soybean. Economic Botany. Vol 4., Issue 4 P 408-421.	M-261917-01-1
Kakade et al., 1972 .Biochemical and nutritional assessment of different varieties of soybeans	M-183138-01-1

Kowite W. 2008. Comparative Assessment of Morphological and Agronomic Characteristics of Glufosinate-tolerant Soybean A5547-127, USA, 2006-2007. Bayer CropScience. Internal Report. 45 pages	M-295867-02-1
Leeson S. 1998. The effect of Glufosinate resistant soybeans (A5547-127) on the growth of female broiler chickens. University of Guelph. 13 pages.	M-141259-01-1
Liener, 1994. IImplications of antinutritional components in soybean foods.	M-204382-01-1
Messina y Barnes, 1991. Commentary The role of soy products in reducing risk of cancer	M-204379-01-1
Moens, 2012. Full DNA sequence of the transgenic and pre-insertion locus of Glycine max transformation event A5547-127. Report BB10-006. 46 pages	M-452853-01-1
Moens 2012 . Description of Vector pB2/35SacK. Aventis CropScience Gent. Internal Report ID pB2/35SAcK-03. 10 pages. #C020823	M-143015-04-2
Oberdoerfer R. 2012. Nutritional Impact Assessment Report on Glufosinate Ammonium Tolerant Soybean Transformation Event A5547-127	M-360323-02-1
OECD 1993. Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role of Modern Biotechnology. Organization for Economic Co-operation and Development. 237 pages. #A67319	M-254383-01-1
OECD 2000. Concensus Document on the biology of Glycine max (L.) Merr. (Soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15. Organization for Economic Co-operation and Development. 22 pages. #C011910	M-201734-02-1
Rackis, 1974. Biological and physiological factors in soybeans	M-204371-01-1
Rascle J. 2009a. PAT/pat protein. Heat stability study. Internal Report Study SA09050. 34 pages.	M-131221-04-1
Rascle 2009b. In vitro digestibility studiy in human simulated gastric fluid. Internal Report SA09048. 40 pages.	M-214025-04-1
Rascle 2009c. In vitro digestibility studiy in human simulated intestinal fluid. Internal Report SA09048. 37 pages.	M-214021-03-1
Servicio de información agrícola y pesquera (SIAP). En línea. Disponible: http://www.siap.gob.mx/	
Shilito R. 2001. Reproductive Biology Data – Group 5 (Event A5547-127) Glufosinate tolerant Soybean. USA. 2000. BayerCropScience. Internal Report 21 pages.	M-238822-01-2
Shillito R. 2003 Phosphinothricin Acetyltransferase content of Processed Fractions of Group 5 (Event A5547-127) Glufosinate-tolerant Soybean, USA, 1999.Final Report. Bayer CropScience. Internal Report. 44 pages.	M-238895-02-1
Shutt, D.A. 1976. Effets des oestrogenes vegetaux sur la reproduction animale.	M-204367-01-1
Van Wert S. 2009. Mendelian Inheritance and Agronomic Performance of Event A5547-127. AgrEvo USA Co. Internal Report. 30 pages.	M- 181487-03-1

II. Identificación de la zona o zonas donde se pretenda liberar el OGM:

a) Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

La liberación de la soya LibertyLink® se realizará en una superficie total de 15 hectáreas, las cuales se encuentran contenidas en el polígono que se adjunta en el Anexo Figura 7. Se importará 750 kg de semilla

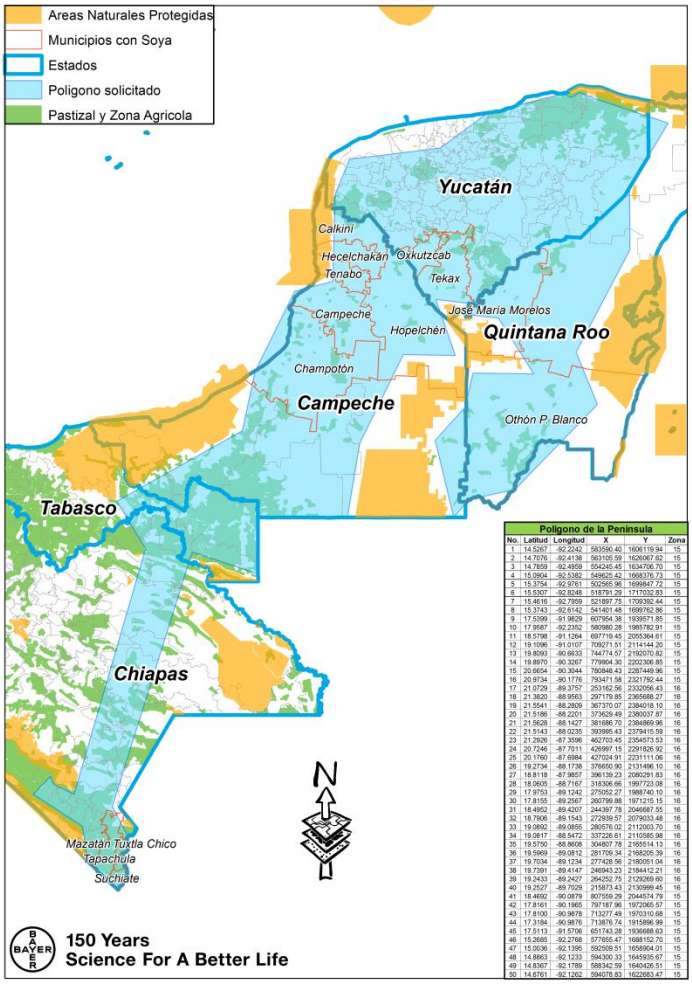
b) Ubicación, en coordenadas UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación, y

Tabla 13. El polígono de liberación al ambiente y sus extremos.

Polígono de la Península					
No.	**Latitud**	**Longitud**	**X**	**Y**	**Zona**
1	14.5267	-92.2242	583590.4	1606119.94	15
2	14.7076	-92.4138	563105.59	1626067.62	15
3	14.7859	-92.4959	554245.45	1634706.7	15
4	15.0904	-92.5382	549625.42	1668376.73	15
5	15.3754	-92.9761	502565.96	1699847.72	15
6	15.5307	-92.8248	518791.29	1717032.83	15
7	15.4616	-92.7959	521897.75	1709392.44	15
8	15.3743	-92.6142	541401.48	1699762.86	15
9	17.5399	-91.9829	607954.38	1939571.85	15
10	17.9587	-92.2352	580980.28	1985782.91	15
11	18.5798	-91.1264	697719.45	2055364.61	15
12	19.1096	-91.0107	709271.51	2114144.2	15
13	19.8093	-90.6633	744774.57	2192070.82	15
14	19.8970	-90.3267	779904.3	2202306.85	15
15	20.6654	-90.3044	780848.43	2287449.96	15
16	20.9734	-90.1776	793471.58	2321792.44	15
17	21.0729	-89.3757	253162.56	2332056.43	16
18	21.3820	-88.9563	297179.85	2365688.27	16
19	21.5541	-88.2809	367370.07	2384018.1	16
20	21.5186	-88.2201	373629.49	2380037.87	16
21	21.5628	-88.1427	381686.7	2384869.96	16
22	21.5143	-88.0235	393995.43	2379415.59	16
23	21.2926	-87.3596	462703.45	2354573.53	16

24	20.7246	-87.7011	426997.15	2291826.92	16
25	20.1760	-87.6984	427024.91	2231111.06	16
26	19.2734	-88.1738	376650.9	2131496.1	16
27	18.8118	-87.9857	396139.23	2080291.83	16
28	18.0605	-88.7167	318306.66	1997723.08	16
29	17.9753	-89.1242	275052.27	1988740.1	16
30	17.8155	-89.2567	260799.88	1971215.15	16
31	18.4952	-89.4207	244397.78	2046687.55	16
32	18.7906	-89.1543	272939.57	2079033.48	16
33	19.0892	-89.0855	280576.02	2112003.7	16
34	19.0817	-88.5472	337226.61	2110585.98	16
35	19.5750	-88.8608	304807.78	2165514.13	16
36	19.5969	-89.0812	281709.34	2168205.39	16
37	19.7034	-89.1234	277428.56	2180051.04	16
38	19.7391	-89.4147	246943.23	2184412.21	16
39	19.2433	-89.2427	264252.75	2129269.6	16
40	19.2527	-89.7029	215873.43	2130999.45	16
41	18.4692	-90.0879	807559.29	2044574.79	15
42	17.8161	-90.1965	797187.96	1972065.57	15
43	17.8100	-90.9878	713277.49	1970310.68	15
44	17.3184	-90.9876	713876.74	1915896.99	15
45	17.5113	-91.5706	651743.28	1936688.63	15
46	15.2685	-92.2768	577655.47	1688152.7	15
47	15.0036	-92.1395	592509.51	1658904.01	15
48	14.8863	-92.1233	594300.33	1645935.67	15
49	14.8367	-92.1789	588342.59	1640426.51	15
50	14.6761	-92.1262	594078.83	1622683.47	15

ANEXO: Polígono de liberación propuesto para la zona Península de Yucatán.



Poligono de la Peninsula

No.	Latitud	Longitud	X	Y	Zona
1	14.5267	-92.2242	583590.40	1606119.94	15
2	14.7078	-92.4138	563105.59	1626067.62	15
3	14.7859	-92.4959	554245.45	1634706.70	15
4	15.0804	-92.5382	549625.42	1668376.73	15
5	15.3754	-92.9761	502565.96	1699847.72	15
6	15.5307	-92.8248	518791.29	1717032.83	15
7	15.4616	-92.7959	521897.75	1709392.44	15
8	15.3743	-92.6142	541401.48	1699762.86	15
9	17.5399	-91.9829	607954.38	1939571.85	15
10	17.9587	-92.2352	580980.28	1985782.91	15
11	18.5798	-91.1264	697719.45	2055364.61	15
12	19.1096	-91.0107	709271.51	2114144.20	15
13	19.8093	-90.6633	744774.57	2192070.82	15
14	19.8970	-90.3267	779904.30	2202306.85	15
15	20.6654	-90.3044	780948.43	2287449.96	15
16	20.9734	-90.1776	793471.58	2321752.44	15
17	21.0729	-89.3757	253162.56	2332056.43	16
18	21.3620	-88.9563	297179.85	2365688.27	16
19	21.5541	-88.2809	367370.07	2384018.10	16
20	21.5186	-88.2201	373629.49	2380037.87	16
21	21.5628	-88.1427	381686.70	2384869.96	16
22	21.5143	-88.0235	393995.43	2379415.59	16
23	21.2826	-87.3596	462703.45	2354573.53	16
24	20.7246	-87.7011	426997.15	2291826.92	16
25	20.1760	-87.6984	427024.91	2231111.06	16
26	19.2734	-88.1738	376650.90	2131496.10	16
27	18.8118	-87.9857	396139.23	2080291.83	16
28	18.0605	-88.7167	318306.66	1997723.08	16
29	17.9753	-89.1242	275052.27	1988740.10	16
30	17.8155	-89.2567	260798.88	1971215.15	16
31	18.4852	-89.4207	244397.78	2046887.55	16
32	18.7906	-89.1543	272939.57	2079033.48	16
33	19.0892	-89.0855	280576.02	2112003.70	16
34	19.0817	-88.5472	337226.61	2110585.98	16
35	19.5750	-88.8608	304807.78	2165514.13	16
36	19.5969	-89.0812	281709.34	2168205.39	16
37	19.7034	-89.1234	277428.56	2180051.04	16
38	19.7391	-89.4147	246943.23	2184412.21	16
39	19.2433	-89.2427	264252.75	2129269.60	16
40	19.2527	-89.7029	215873.43	2130999.45	16
41	18.4692	-90.0879	807559.29	2044574.79	15
42	17.8161	-90.1965	797187.96	1972065.57	15
43	17.8100	-90.9878	713277.49	1970310.68	15
44	17.3184	-90.9876	713876.74	1915896.99	15
45	17.5113	-91.5706	651743.28	1936688.63	15
46	15.2685	-92.2768	577655.47	1688152.70	15
47	15.0036	-92.1395	592509.51	1658954.01	15
48	14.8863	-92.1233	594300.33	1645935.67	15
49	14.8367	-92.1789	588342.59	1640426.51	15
50	14.8761	-92.1262	594078.83	1622683.47	15

Figura 7. Polígono seccionado donde se liberará la soya LibertyLink en la región agrícola de los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas.

c) Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según las características de diseminación del OGM de que se trate.

1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos

No existen parientes silvestres o especies compatibles sexualmente con la soya en el área de liberación y en zonas vecinas. El único cultivo con el cual podría cruzarse son otros cultivos comerciales de soya, para lo cual Bayer de México S.A. de C.V. propone una serie de medidas de bioseguridad que se mencionan en la sección IV.

2. Descripción geográfica

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en las regiones de los siguientes estados, indicándose los respectivos municipios. Para Campeche: Calkiní, Hecelchakán, Tenabo, Campeche, Hopelchén y Champotón; en Quintana Roo: Othón P. Blanco y José María Morelos; Yucatán: Oxkutzcab y Chiapas: Mazatán, Tuxtla Chico, Tapachula y Suchiate.

Adyacente a estos valles agrícolas se encuentran algunas áreas naturales protegidas Ver Figura 8. Existe sin embargo, el compromiso y obligación de Bayer de México S.A. de C.V de no realizar ninguna liberación al ambiente de soya LibertyLink® fuera de los polígonos solicitados y descritos anteriormente.

Asimismo, en la Figura 9 se muestran las vías de comunicación terrestres y las ecorregiones del polígono.

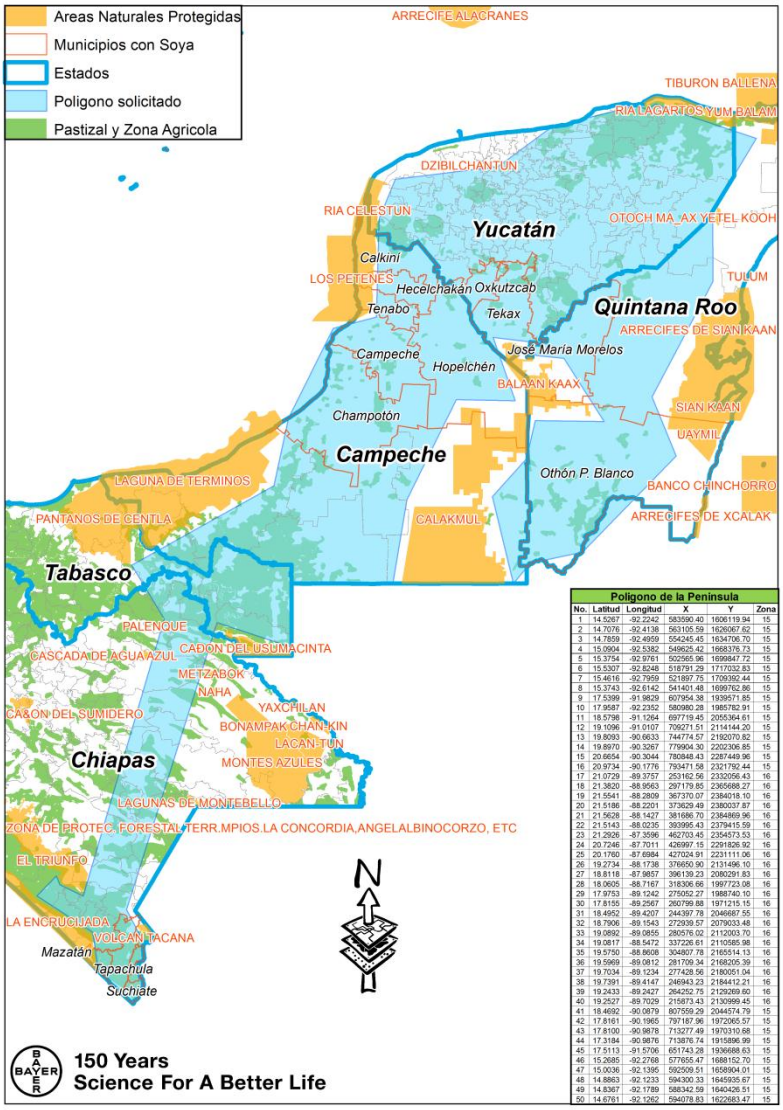


Figura 8. Polígono de liberación propuesto para la zona Península de Yucatán incluyendo las Áreas Naturales Protegidas.

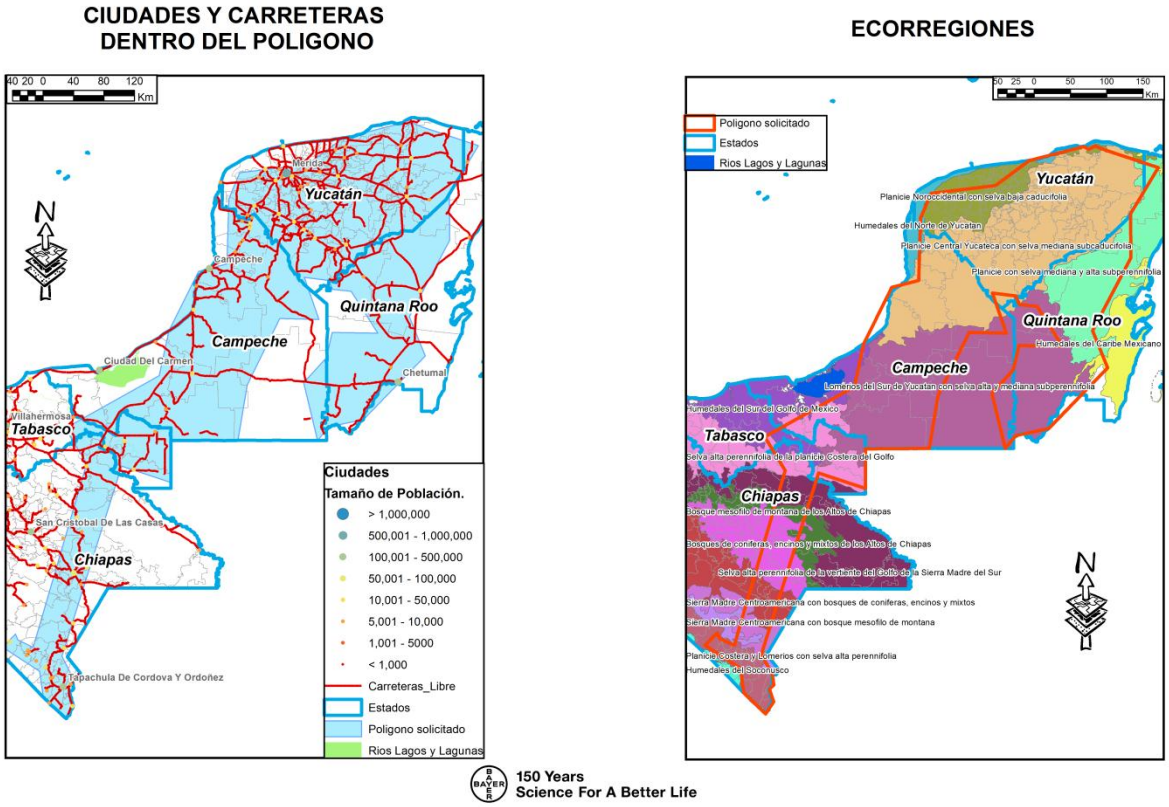


Figura 9. Polígono de liberación propuesto para la zona Península de Yucatán incluyendo las vías de comunicación terrestre y las ecorregiones.

III. Estudio de los posibles riesgos que la liberación de los OGMs pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica a los que se refiere el artículo 42, fracción III, de la Ley. Contendrá, además de lo dispuesto en el artículo 62 de la Ley, la información siguiente:

a) Estabilidad de la modificación genética del OGM

Durante el transcurso del desarrollo del evento de soya A5547-127, se realizaron estudios para evaluar las características reproductivas, de diseminación y supervivencia de la soya conteniendo el gen pat comparada con el control. Las conclusiones de estos ensayos son que el evento de soya A5547 es equivalente al organismo receptor en todos estos aspectos.

La evaluación consideró la comparación del evento de soya A5547-127y la variedad de soya receptora, A5547 en cuanto a su capacidad reproductiva, morfología de planta, desarrollo agronómico y susceptibilidad a enfermedades. No se observaron cambios en la fertilidad, morfología floral o diseminación del polen por los expertos mejoradores en el curso del programa de desarrollo de variedades (en curso desde 1995). La única diferencia es la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Esta tolerancia permite a las plantas sobrevivir a la aplicación del herbicida.

A lo largo de la historia de ensayos a campo con el evento A5547-127 no se observaron diferencias que pudieran ser atribuidas a los efectos pleiotrópicos de la inserción del gen pat, ni se vió que el evento A5547-127 fuera diferente del organismo receptor en relación a las características agronómicas o reproductivas.

Modo y tasa de reproducción: La modificación genética introducida en el cultivo de soya genera como único cambio fenotípico la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Esta modificación no genera cambios en el modo o la tasa de multiplicación del cultivo y no se han observado en los ensayos efectos no esperados asociados a la modificación genética.

Se realizaron observaciones que pueden definir la fertilidad y la fecundidad para comparar el evento transformado A5547-127 con su variedad parental A5547 (Kowite W. 2008, M-295867-03-1).

La fertilidad fue testeada mediante la evaluación de la morfología y viabilidad del polen por tinción vital y por germinación del tubo de polen en soluciones de glicerol. No se observaron diferencias estadísticas ni en la viabilidad ni en el porcentaje de germinación del polen. La morfología de las estructuras florales se comparó por fotografía en estadios de desarrollo similares. La fertilidad del evento de soya A5547-127 no es diferente de la del A5547 (Shillito R. 2001, M-238822-01-2).

Diseminación y supervivencia: La soya es un cultivo anual con autopolinización propagado comercialmente por medio de semillas. Normalmente no presenta dormancia y solo bajo condiciones especiales puede dar lugar a la aparición de plantas voluntarias. El comportamiento del cultivo no se asemeja a las características de las malezas y no se lo encuentra fuera del cultivo. Sus características lo hacen muy susceptible a heladas a sequía y a inundaciones y la semilla sobrevive pobremente en el suelo. La introducción del gen pat no modifica ninguna de las características mencionadas y no afecta su persistencia o invasividad.

Además, en los ensayos realizados en Brasil en los años 1996 y 1997 no se observó la aparición de plantas voluntarias (Van Wert, 2009, M- 181487-03-1) y se verificó en ensayos realizados en el año 2000 que el evento de soya A5547-127 conserva su susceptibilidad al herbicida Roundup® (Freyssinet, 2002b, M-208502-01-1) lo que provee de una herramienta sencilla para el control de eventuales plantas voluntarias.

Para confirmación de la segregación y transferencia a la progenie, la transferencia del inserto presente en el evento de soya A5547-127 y su patrón de segregación fue verificada hasta las generaciones R2 y R3 (Van Wert, 2009, M-181487-03-1).

Para lograr estás líneas se autopolinizaron las transformantes originales (R0) obteniendo plantas R1 sensibles y tolerantes a glufosinato de amonio. Las plantas tolerantes fueron nuevamente autopolinizadas para obtener la generación R2.

Es de esperar que si las plantas presentan homocigocis respecto del locus pat toda su progenie sea tolerante al herbicida, y que si la planta es heterocigota, su progenie guarde una relación tolerante: sensible de 3:1.

Entonces, si el locus pat se hereda establemente, toda la progenie de una planta homocigota debería presentar tolerancia al herbicida. Esto fue evaluado durante tres generaciones consecutivas y se corroboró para todas las plantas homocigotas analizadas.

Los estudios realizados con plantas hemicigotas y el análisis molecular realizado hasta la generación R5 confirman y refuerzan estas conclusiones.

Para caracterizar el patrón de segregación del evento de soya A5547-127 se obtuvo la progenie de plantas homocigotas y heterocigotas. Los resultados mostraron que toda la progenie de plantas homocigotas tiene tolerancia a glufosinato de amonio.

Cuando se autopolinizaron la plantas R0 tolerantes a glufosinato de amonio se obtuvieron hileras completamente tolerantes al herbicida e hileras con tolerancia parcial o nula en una proporción 1:2 (Tabla 14). Es de suponer que la tolerancia parcial se deba a la hemicigosis para el locus pat.

La autopolinización de las plantas R1 con tolerancia parcial (presumiblemente hemicigotas) dieron como resultado plantas R2 tolerantes en una proporción 3:1 con respecto a las plantas sensibles. Estos resultados demuestran que el inserto presente en el evento de soya A5547-127 (locus pat) se hereda como un locus mendeliano dominante simple (Van Wert, 2009, M- 181487-03-1).

Tabla 14. Patrón de segregación del locus *pat* del evento de soya A5547-127

Comparación	Progenie	Plantas resistentes	Plantas sensitivas	Radio esperado	Original X2	Verified X2
Hilera 1	R3	66	16	3:1	1.52	1.32
Hilera 2	R3	141	36	3:1	1.97	2.05
Hilera 3	R3	35	7	3:1	1.84	1.56
Hilera 4	R3	50	11	3:1	1.46	1.58
Hilera 7	R3	40	7	3:1	2.72	2.56
Hilera 9	R3	73	13	3:1	4.8	4.48
Hilera 10	R3	43	8	3:1	2.51	2.36
Hilera 11	R3	34	6	3:1	2.13	2.13
Hilera 13	R3	34	8	3:1	1.02	0.79
Hilera 14	R3	32	3	3:1	5.26	5.04
Hilera 16	R3	41	10	3:1	0.89	0.79
Hilera 17	R3	36	10	3:1	0.4	0.26
Hilera 21	R3	76	21	3:1	0.52	0.58
Hilera 22	R3	47	8	3:1	3.37	3.21
Hilera 23	R3	120	31	3:1	1.69	1.61
Hilera 25	R3	141	22	3:1	11.68	11.50
Hilera 26	R3	143	53	3:1	0.44	0.44
Hilera 27	R3	80	16	3:1	3.56	3.56
Hilera 29	R3	119	25	3:1	4.48	4.48
Hilera 30	R3	148	46	3:1	0.23	0.17
Hilera 31	R3	34	8	3:1	1.02	0.79

El análisis molecular (Southern blot, PCR) y la estabilidad del locus pat en el evento de soya A5547-127 fue demostrada por medio de experimentos de Southern Blot en tres generaciones consecutivas. La sonda utilizada para detectar la presencia del inserto en las distintas muestras corresponde al fragmento EcoRI del plásmido pB2/35SAcK (Figura 5) (De Beuckeleer 1998, M-183196-01-1).

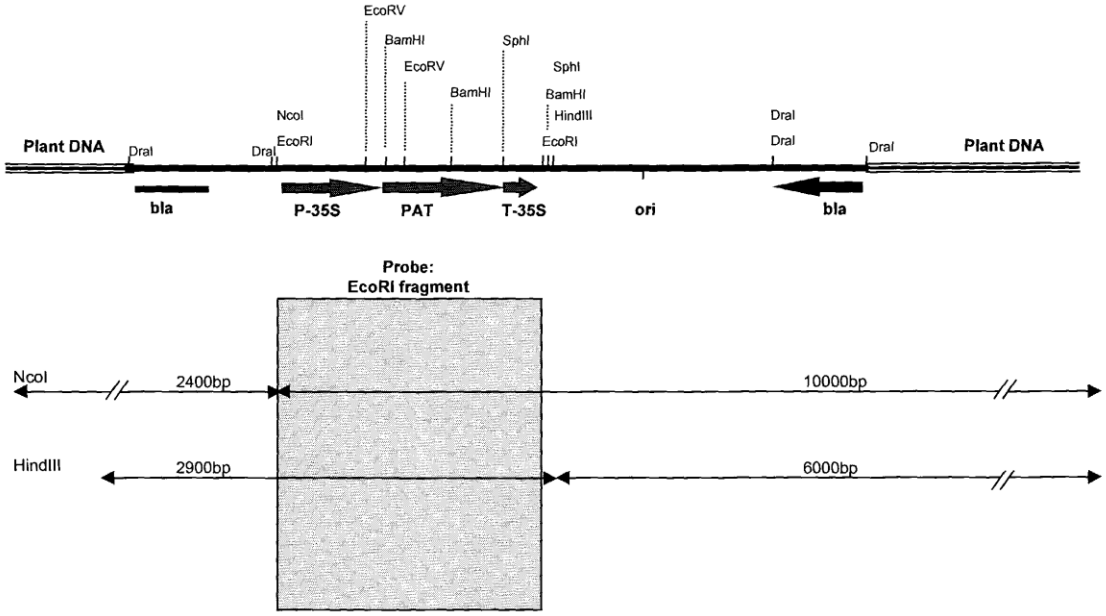


Figura 10. Zona de hibridación de la sonda utilizada para la demostración de la estabilidad del evento.

Los resultados obtenidos para las generaciones R3 a R5 se muestran en la **Figura 11**

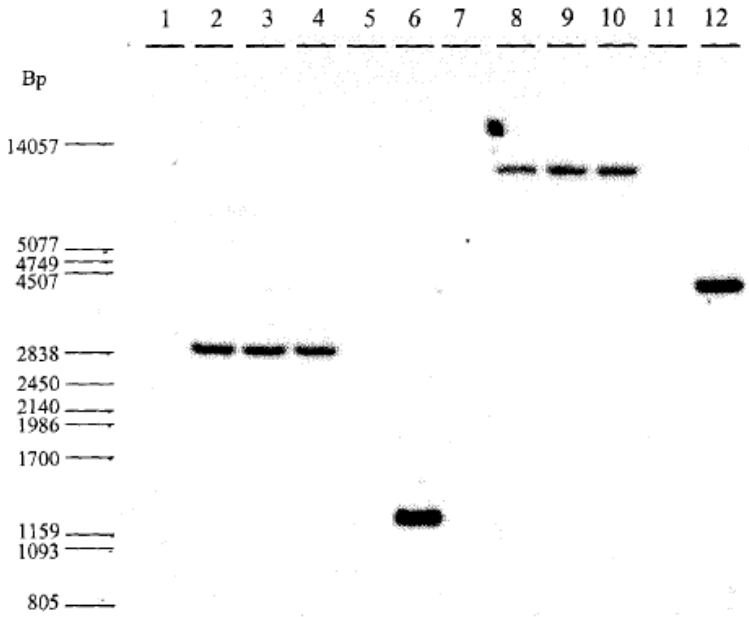


Figura 11. Estabilidad del inserto en generaciones sucesivas

10 µg de ADN genómico de hojas del evento de soya A5547-127 (generaciones R_3 a R_5) fueron digeridos con las enzimas *Nco*I o *Hind*III e hibridados con la sonda *pat* (fragmento *Eco*RI del plásmido pB2/35SAcK, 1329 pb).

1. λ ADN digerido con *Pst*I
2. A5547-127- R3 digerido con *Hind*III
3. A5547-127- R4 digerido con *Hind*III
4. A5547-127- R5 digerido con *Hind*III
5. A5547 – *Hind*III
6. A5547 silvestre digerido con *Hind*III + 1 copia de pB2/35SAcK digerido con *Eco*RI
7. Calle sin sembrar
8. A5547-127- R3 digerido con *Nco*I
9. A5547-127– R4 digerido con *Nco*I
10. A5547-127– R5 digerido con *Nco*I
11. A5547 digerido con *Nco*I
12. A5547 digerido con *Nco*I + 1 copia de pB2/35SAcK digerido con *Nco*I

Como se puede observar en la Figura 11, El patrón de bandas observado corresponde a lo esperado para las enzimas utilizadas en la digestión del ADN del evento, así como para el plásmido utilizado en la transformación. Este patrón se mantiene constante a lo largo de las 3 generaciones analizadas, demostrando la estabilidad del evento.

b) Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína de interés en los diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren.

La expresión de la proteína PAT fue evaluada en raíces, tallo, hojas y semillas provenientes de ensayos en invernáculo y a campo. Todas las determinaciones fueron realizadas mediante la técnica de ELISA (De Wulf y De Pestel, 2007, M-293325-01-1).

Para el caso de raíces, tallo y hojas las muestras fueron tomadas a partir de plantas cultivadas en invernáculo y asperjadas con glufosinato de amonio previo a la toma de muestra. Los contenidos promedio en cada tejido y para cada estado de desarrollo se muestran en la Tabla 15 y en la Figura 12.

Tabla 15. Contenido de PAT en raíces, tallos y hojas

Tejido	Contenido promedio de PAT (µg/g) ± SD		Proteínas totales Extraíbles (TEP) % de peso fresco		Contenido promedio de PAT como % de TEP	
	V_3	V_8	V_3	V_8	V_3	V_8
Hoja	18.40 ± 6.50	26.22 ± 9.87	8.43 ± 1.40	3.65 ± 1.12	0.22	0.73
Tallo	39.18 ± 3.04	13.85 ± 6.12	4.75 ± 0.35	1.84 ± 1.05	0.83	0.84
Raíz	8.16 ± 2.50	3.60 ± 0.42	2.53 ± 0.40	1.20 ± 0.38	0.32	0.32

No se detectó la presencia de PAT en muestras provenientes de plantas no genéticamente modificadas (A5547).

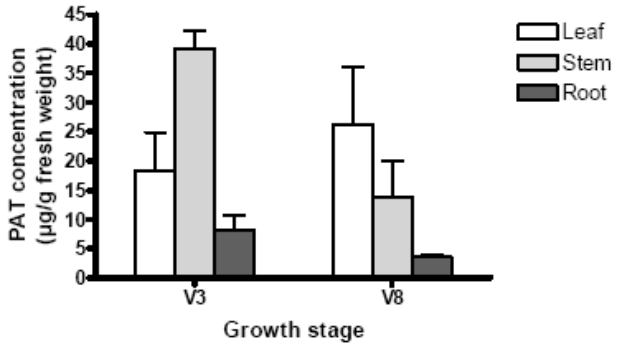


Figura 12. Contenido de PAT en los diferentes tejidos en estadios V3 y V8

Como puede observarse, el contenido de PAT en los tejidos se encuentra dentro del mismo orden de magnitud y siempre por debajo del 0,8% de las proteínas totales extraíbles de la muestra.

El contenido de PAT también fue cuantificado en semillas provenientes del evento de soya A5547-127 (Shillito, 2003, M-238895-01-1). Para esto se consideraron muestras de semillas provenientes de plantas del evento de soya A5547-127 y de su contraparte no genéticamente modificada (A5547) cultivadas a campo en la región de Florida en el año 1999. La semilla utilizada para este ensayo proviene de 9 lotes:

- 3 parcelas de plantas A5547 (no transgénicas)
- 3 parcelas del evento A5547-127
- 3 parcelas del evento A5547-127 asperjado con glufosinato de amonio (GA 0.35 lb ai/acre)

Los resultados obtenidos (Tabla 16) demuestran que los contenidos de PAT en la semilla son extremadamente bajos.

Tabla 16. Contenido de PAT en la semilla del evento de soya A5547-127

PAT (µg/g peso fresco) ± SD		% proteínas totales		PAT % crude protein	
Asperjado con GA	Sin asperjar	Asperjado con GA	Sin asperjar	Asperjado con GA	Sin asperjar
0.017471	0.020202	36.5	38.8	0.0048	0.0056

No fue detectada la presencia de PAT en semillas provenientes de plantas no genéticamente modificadas.

c) Características del fenotipo del OGM

La característica introducida en el evento de soya A5547-127 es la expresión estable y constitutiva de la proteína PAT, que le confiere a la planta de soya LibertyLink tolerancia al herbicida Glufosinato de Amonio. A continuación se describe el mecanismo por el cual esta modificación resulta en el fenotipo de tolerancia.

La enzima Glutamino Sintetasa (GS) juega un rol central en el metabolismo de nitrógeno de las plantas superiores donde es la única enzima en plantas que puede detoxificar el amoníaco liberado por la reducción de nitrato, degradación de aminoácidos y fotorespiración. El amoníaco, aun siendo un nutriente vegetal es tóxico si se encuentra en exceso y lleva a la muerte de la célula vegetal.

La L-fosfinotricina es un potente inhibidor de la enzima Glutamino Sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une competitivamente a la enzima desplazando al L-glutamato del sitio activo.

Si bien la GS de S. *viridochromogenes* es sensible a L-fosfinotricina, la bacteria produce una enzima (PAT) que la inactiva. PAT cataliza la conversión de L-fosfinotricina a N-acetil-L-fosfinotricina en presencia de acetil CoA como co-substrato. N-acetil-L-fosfinotricina no inhibe a GS, y, por lo tanto, no tiene actividad herbicida.

La enzima PAT está codificada por el gen pat en S. *viridochromogenes*. Este gen funciona como una parte integral de la ruta biosintética de bialaphos y confiere la tolerancia a glufosinato de amonio (Bayer et al., 1972 M-117813-01-2).

d) Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y en el medio ambiente receptor del OGM

Ninguna. Específicamente sólo es la característica fenotípica explicada en el punto c) anterior.

e) Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya al menos, ciclo biológico y cambios en la morfología básica

Para caracterizar el patrón de segregación del evento de soya A5547-127 se obtuvo la progenie de plantas homocigotas y heterocigotas. Los resultados mostraron que toda la progenie de plantas homocigotas tiene tolerancia a glufosinato de amonio.

Cuando se autopolinizaron la plantas R0 tolerantes a glufosinato de amonio se obtuvieron hileras completamente tolerantes al herbicida e hileras con tolerancia parcial o nula en una proporción 1:2. (Tabla 17). Es de suponer que la tolerancia parcial se deba a la hemicigosis para el locus pat.

La autopolinización de las plantas R1 con tolerancia parcial (presumiblemente hemicigotas) dieron como resultado plantas R2 tolerantes en una proporción 3:1 con respecto a las plantas sensibles (Tabla 17).

Estos resultados demuestran que el inserto presente en el evento de soya A5547-127 (locus pat) se hereda como un locus mendeliano dominante simple (Van Wert, 2009, M- 181487-03-1).

Tabla 17. Patrón de segregación del locus *pat* del evento de soya A5547-127

Comparación	Progenie	Plantas resistentes	Plantas sensitivas	Radio esperado	Original X2	Verified X2
Hilera 1	R3	66	16	3:1	1.52	1.32
Hilera 2	R3	141	36	3:1	1.97	2.05
Hilera 3	R3	35	7	3:1	1.84	1.56
Hilera 4	R3	50	11	3:1	1.46	1.58
Hilera 7	R3	40	7	3:1	2.72	2.56
Hilera 9	R3	73	13	3:1	4.8	4.48
Hilera 10	R3	43	8	3:1	2.51	2.36
Hilera 11	R3	34	6	3:1	2.13	2.13
Hilera 13	R3	34	8	3:1	1.02	0.79
Hilera 14	R3	32	3	3:1	5.26	5.04
Hilera 16	R3	41	10	3:1	0.89	0.79
Hilera 17	R3	36	10	3:1	0.4	0.26
Hilera 21	R3	76	21	3:1	0.52	0.58
Hilera 22	R3	47	8	3:1	3.37	3.21
Hilera 23	R3	120	31	3:1	1.69	1.61
Hilera 25	R3	141	22	3:1	11.68	11.50
Hilera 26	R3	143	53	3:1	0.44	0.44
Hilera 27	R3	80	16	3:1	3.56	3.56
Hilera 29	R3	119	25	3:1	4.48	4.48
Hilera 30	R3	148	46	3:1	0.23	0.17
Hilera 31	R3	34	8	3:1	1.02	0.79

Nota: Los valores que difieren con los valores verificados están subrayados y así los valores verificados corregidos ya son mostrados en la última columna.

f) Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que se puedan derivar de la liberación del OGM

Ninguno. El cultivo de soya modificada con las características de tolerancia a herbicidas tiene una historia larga de uso seguro.

Los hallazgos significativos de la evaluación ambiental del USDA sobre el evento de transformación A5547-127 incluyen algunos puntos que se señalan a continuación:

- No se exhiben propiedades de patogenicidad vegetal.
- No es más probable que este evento se convierta en maleza en relación con las líneas de soya desarrolladas por mejoramiento convencional de plantas.

- Las características físicas y la susceptibilidad a plagas fueron comparadas con los atributos de la soya no transgénica durante las evaluaciones a campo y no se observaron diferencias obvias con respecto a la cantidad de semilla producida, características de germinación, stand final o susceptibilidad a patógenos.
- Es muy improbable que se aumente el potencial de maleza de cualquier otra especie por inter cruzamientos.
- No se encontraron impactos en organismos no blanco, incluyendo especies amenazadas y en peligro u organismos benéficos.

g) Descripción de uno o más métodos de identificación del evento específico del OGM, incluyendo niveles de sensibilidad y reproducibilidad, con la manifestación expresa del promovente de que los métodos de identificación son los reconocidos por el desarrollador del OGM para la detección del mismo.

Métodos moleculares: Para una detección rápida y simple de plantas A5547-127 se pueden utilizar las tiras de flujo lateral disponibles comercialmente. Además están disponibles métodos de ELISA y PCR para una detección de rutina cuantitativa y semi-cuantitativa del evento A5547-127. Una mayor sensibilidad puede alcanzarse utilizando la técnica de PCR en tiempo real validado internacionalmente para este evento.

Métodos biológicos: Se puede utilizar la característica de tolerancia al herbicida glufosinato de amonio para detectar aquellas plantas de soya que contengan el evento A5547-127.

h) Existencia de potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas

No hay evidencia de transferencia genética ni intercambio bajo condiciones naturales con organismos que no sean aquellos con los que la soya puede producir cruzamientos fértiles a través de la reproducción sexual. No hay indicaciones que el potencial para intercambio exitoso de material genético haya cambiado debido a la modificación genética. El inserto no posee una capacidad intrínseca para transferir los genes insertados por auto transferencia o re-movilización.

Transferencia de genes de Planta a Bacteria: Para que la transferencia horizontal de genes genere un nuevo tipo de microorganismo y, por lo tanto, produzca un impacto significativo, algunas de las siguientes condiciones deben ser observadas:

- La incorporación debería ser de ADN completo sin degradar.
- Los genes de la planta deberían dar como resultado una expresión significativa en un entorno procariótico.
- La expresión debería representar un aumento significativo sobre el nivel del entorno
- La característica debería proveer una ventaja competitiva a la cepa en la cual es incorporada.

Transferencia de genes entre plantas: La soya (*Glycine max*) se considera una especie de auto-fecundación, con una tasa de polinización cruzada menor al 1%. La soya es también altamente compatible con la especie silvestre relacionada *Glycine soya*. Esta especie, así como otras soyas silvestres relacionadas (*Glycine max*), se encuentra solo en Australia, sur de China, Taiwán, Filipinas, Papua Nueva Guinea y varias islas del Pacífico Sur.

Los estudios realizados sobre la biología reproductiva y las características agronómicas de plantas derivadas del evento A5547-127 permiten concluir que estas tienen las mismas capacidades y limitaciones reproductivas que la soya producida por mejoramiento convencional y que no son diferentes de otras soyas con respecto a la auto fecundación o la fecundación cruzada.

i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.

Mismas fuentes presentadas en la tabla de la página 72.

IV. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad y de bioseguridad a llevar a cabo.

a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad:

1. Plan de monitoreo detallado.

Se efectuará un monitoreo comprensivo durante la liberación y todo el ciclo de cultivo de soya LibertyLink®. Las actividades incluyen:

- Efectuar una localización georreferenciada de los lotes de los agricultores cooperantes que siembren la soya LibertyLink® con el propósito de tener un control sobre los sitios de liberación y de esa manera evitar que se siembre en predios no autorizados. En este caso la liberación se efectuará al interior de un campo experimental de una institución reconocida.
- Realizar un monitoreo de canales de riego y drenes adyacentes a los predios con el fin de detectar el posible establecimiento de plántulas en sus orillas.
- Realizar una capacitación a todo el personal involucrado en el proceso de producción con el objeto de que toda persona relacionada con el cultivo conozca las posibles implicaciones, riesgos y beneficios de uso y manejo de la soya LibertyLink®. Además, todo el personal involucrado deberá saber que debido a que soya LibertyLink® tiene como características la tolerancia a la aplicación del herbicida Glufosinato, es posible detectarla con facilidad con respecto a otro tipo de soya.

El plan de capacitación incluye:

Grupo de capacitación	Responsable de la capacitación	Fecha de la capacitación
Investigadores responsables	Personal de asuntos regulatorios y técnicos de Bayer Cropscience.	Sesiones en Agosto de 2013.
Personal asistente de los investigadores	Investigadores responsables	Sesiones en Agosto de 2013.

- El programa de monitoreo se realizará en las zonas donde se siembre la soya biotecnológica durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de soya voluntarias que puedan expresar el evento LibertyLink® y procediendo a su destrucción.

2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM, con el fin de detectar cualquier interacción entre el OGM y especies presentes relevantes, directa o indirectamente, en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación, cuando existan.

El programa de monitoreo se realizará en las zonas donde se siembre la soya biotecnológica LibertyLink® durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento LibertyLink® y procediendo a su destrucción. Se implementarán las siguientes estrategias:

- Se deberá llevar a cabo un monitoreo de voluntarios de todos los predios regulados con el fin de prevenir la presencia en el medio ambiente de un material regulado. Los voluntarios descubiertos deben ser destruidos, documentados, y no se debe dejar que lleguen a la floración.
- En las zonas donde haya sido sembrada las variedad con el evento LibertyLink® deberán hacerse monitoreos de voluntarias durante un periodo no menor a los 12 meses después de la destrucción del campo experimental de la soya. El monitoreo deberá incluir los bordes.
- Si se siembra otro evento regulado del mismo cultivo en la misma área, el monitoreo no es necesario hasta que se termine la nueva prueba regulada. Cualquier parcela de la temporada anterior que no esté sembrada con la nueva prueba regulada debe ser monitoreado para buscar voluntarios.
- Los monitoreos empezarán después de la destrucción del campo experimental de soya, mensualmente y cuando se observan plantas voluntarias éstas deberán ser destruidas antes de que floreen, por medios de control químico o de manera manual. Cuando no se observen voluntarios en dos visitas consecutivas se podrá dejar de visitar ese predio.

3. Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación.

Se efectuará un monitoreo de plantas voluntarias como se describió anteriormente. Además, en el siguiente ciclo de siembra de la soya, en caso de ser necesario y donde llegara a existir controversia respecto al origen de la soya que se esté sembrando en la zona de liberación y zonas vecinas, se utilizarán tiras reactivas para detectar el evento LibertyLink® en muestras de hojas.

b) Medidas y procedimientos de bioseguridad:

1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación

Si ocurriese una liberación accidental durante el transporte de la semilla, se procederá a la limpieza de todos los materiales involucrados y al aviso de dicha situación al personal de Bayer de México S.A. de C.V. Asimismo, dentro de las 24 horas siguientes al evento se dará aviso a las autoridades del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

Como se menciona en el plan de monitoreo, se mantendrá un control de los predios por medio de su ubicación georreferenciada y de esta manera prevenir que los productores siembren soya LibertyLink® fuera de los predios autorizados.

Deberá efectuarse una revisión de la maquinaria e implementos utilizados que pudieran contener semilla durante el ciclo del cultivo y deberán ser limpiados después de efectuar los trabajos correspondientes. La semilla que pudiera obtenerse será destruida. La soya es una planta que no se reproduce vegetativamente cuando crece en el campo, de tal manera que la única forma de que la soya transgénico sobreviva es mediante la diseminación por semilla.

El manejo en campo de la soya LibertyLink® será siempre realizado por personal capacitado y experimentado en el manejo de este tipo de material.

El acceso a los lotes donde se sembrará la soya LibertyLink® estará restringido sólo a personal autorizado por la compañía para tal fin y personal del investigador responsable.

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

Las siguientes medidas serán implementadas:

Dado que no existen parientes silvestres o especies compatibles sexualmente con la soya en el área de actividad utilizadas por la compañía en esta región, la única soya con la cual podría cruzarse son otros cultivos comerciales. Para evitar la dispersión de la soya se han tomado las siguientes medidas de bioseguridad:

- Limpiar la maquinaria e implementos que pudieran contener semilla utilizados durante el ciclo del cultivo, después de efectuar los trabajos correspondientes y destruir cualquier semilla que pudiera obtenerse. La soya es una planta que no se reproduce vegetativamente cuando crece en el campo, de tal manera que la única forma de que la soya transgénica sobreviva es mediante la diseminación por semilla.
- Realizar un programa de monitoreo de voluntarios en las áreas donde se siembre la soya biotecnológica durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de soya voluntarias que puedan expresar el evento LibertyLink® y procediendo a su destrucción por medios químicos o manuales.
- Si bien el movimiento de polen de la soya es muy limitado, los lotes de ensayo se ubican en áreas que cuentan con barreras físicas naturales provistas por la vegetación circundante. Estas barreras sirven de freno a cualquier movimiento poco probable de flores o polen causado por el viento.

Tal como se indicó previamente, la soya es considerada una especie de auto-fecundación, propagada comercialmente por semillas. Exhibe un alto porcentaje de auto-fecundación y la polinización cruzada es usualmente menor al uno por ciento (OECD, 1993, M-254383-01-1; OECD, 2000, M-201734-02-1).

El acceso a los lotes donde se siembra material regulado estará restringido sólo a personal autorizado por la compañía para tal fin y personal del agricultor cooperante. En el caso de que personas no autorizadas ingresen a la zona de liberación, el agricultor cooperante notificará el hecho a Bayer de México S.A. de C.V., quien a su vez dará aviso al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

3. Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas

Puesto que el experimento se establecerá sólo al interior de un campo experimental de una institución reconocida, las medidas y procedimientos de bioseguridad propuestos están diseñados para evitar cualquier contingencia, de tal forma que existe un riesgo bajo de que cualquier evento de este tipo pueda ocurrir, sin embargo, en caso de identificar predios sembrados con soya LibertyLink® se procederá a la integración de un registro de quién o quiénes hayan procedido fuera de la ley y se actuará de acuerdo a los procedimientos legales que corresponden. El hecho se informará al del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar experimentalmente el OGM

La zona donde se pretende liberar la soya LibertyLink® está bien caracterizada. Existe el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V. de liberar la soya LibertyLink® sólo dentro del polígono de liberación propuesto en esta solicitud. Lo anterior se mantendrá controlado con la ubicación de las coordenadas GPS del experimento. Por tratarse de un experimento confinado, se sembrará una franja perimetral de 10 m con soya convencional alrededor de la superficie sembrada con la soya GM, como medida de contención. Esto mejor no hay que comprometerlo, mejor esperemos a ver si la autoridad lo pone en sus condicionantes. Además, se informará de dicha liberación a los agricultores vecinos de los predios en los que se sembrará la soya LibertyLink®. Lo anterior tendiente a mantener claramente definidos los sitios de liberación.

5. Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado

No aplica. La soya que expresa la proteína PAT tiene una historia larga de uso seguro y un análisis de riesgo ha demostrado que la soya LibertyLink® no posee algún riesgo para el ambiente, ni para la flora o la fauna. La soya LibertyLink® sólo se distingue de su contraparte convencional por la tolerancia que tiene al herbicida glufosinato de amonio, atributo conferido por la expresión de la proteína PAT.

6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación.

Una parte de la cosecha de la soya LibertyLink® sería destruida previo a la cosecha. Las muestras de semilla que podrían ser utilizadas para el análisis de la calidad serán también destruidas, una vez que éste concluya.

Otra parte de la cosecha, podría ser adquirida por parte de un procesador, para lo cual se establecería un contrato especificando las obligaciones y responsabilidades

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.

a) Descripción de la zona en donde se realizó la liberación

La soya que porta genes de tolerancia a la aplicación del herbicida glufosinato ha sido aprobada comercialmente en varios países.

En México, un cultivo de soya con este evento sería por primera vez liberado de forma experimental bajo el nombre comercial de LibertyLink®. Esta misma ha sido aprobada y liberada comercialmente en varios países Tabla 18.

PAIS y REGIÓN o LOCALIDAD	*TIPO DE LIBERACIÓN AUTORIZADA*	*FECHA*	*CODIGO/ N°PERMISO O EXPEDIENTE*	*ENTIDAD QUE OTORGO AUTORIZACIÓN*
USA	Alimentación humana Alimentación animal Cultivo	1998 1998 1998	BNF No. 000055 Docket N. 98-032-1[1]	FDA, USDA[1]
Canadá	Alimentación humana Alimentación animal Cultivo	2000 2000 2006		CaH: Canada Health[2]
Japón	Alimentación humana Alimentación animal Liberación al ambiente	2002 2003 2001		MHLW: Ministry of Health, Labour and Welfare. MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
European Union	Alimentación humana Alimentación animal	2012	10. February 2012	EFSA:European Food Safety Agency
Korea	Alimentación humana Liberación al ambiente	2011	Food 6. Oct 2011 Environment/Feed 29.Aug 2011	KFDA: Korea Food and Drug Administration; now renamed to: Ministry of Food and Drug

[1] http://www.epa.gov/cgi-bin/epaprintonly.cgi

				Safety (MFDS). RDA: Korea Rural Department of Agriculture;
México	Alimentación humana Alimentación animal	2003 2000		SSA: Health Ministry, Mexico
Philippines	Alimentación humana Alimentación animal	2011	Food/Feed 23. June 2011	PhDA: Philippines Department of Agriculture;
Rusia	Alimentación humana Alimentación animal	2002 2007	KGM-A1-2.7/0067 77.99.04.972. G.000005.07.02	MHCSP: Ministry of Health Care and Social Progress
Taiwan	Alimentación humana (Food)	2010	0991302813	Food and Drug Administration of Department of Health
Australia / N Zelanda	Alimentación humana	2004		**FSANZ:** Food Standards Australia New Zealand
Uruguay	Alimentación humana Alimentación animal	2012	Food/Feed/Cultivation 19. Sep 2012	**MGAP:** Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca **ERB :** Coordinación Evaluación del Riesgo en Bioseguridad
Brazil	Alimentación humana Alimentación animal	2010 2010		
Argentina	Alimentación humana Alimentación animal Cultivo	2008 2008 2001	10.635/2001 10.635/2001 800-007376/2000	**CONABIA:** Secretaría de Agricultura

Tabla 18. Resumen de eventos regulatorios para soya.

b) Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna.

Habiéndose demostrado la equivalencia sustancial entre el evento de soya A5547-127 y cualquier variedad de soya se presenta como única diferencia entre ambas la presencia del producto de expresión de la modificación genética: la proteína PAT. Los estudios biológicos, bioquímicos y bioinformáticos realizados demuestran que esta proteína no es tóxica para humanos o animales.

PAT pertenece al grupo de las acetil transferasas y es similar en cuanto a su estructura bidimensional, inmunoreactividad, peso molecular y propiedades funcionales con otras acetil transferasas comunes en plantas y animales que forman parte de la dieta humana y animal y su presencia en los alimentos no representa una nueva exposición. Cabe destacar que no existen reportes que indiquen que esta clase de enzimas sea potencialmente tóxica o alergénica.

En cualquier caso, se realizaron una serie de ensayos biológicos y bioinformáticos cuyos resultados se resumen a continuación: PAT no comparte homología de secuencia con toxinas o alérgenos conocidos y no es estable en las condiciones que debe afrontar en el tubo digestivo. Más aún, no demostró toxicidad cuando fue inyectada por vía intravenosa en ratones. Una demostración detallada de la ausencia del carácter tóxico de PAT puede encontrarse en (Hérouet *et al.*, 2005, M-247779-01-1).

La proteína PAT no tiene antecedentes que sugieran posibles efectos tóxicos ni homología con proteínas tóxicas o alergénicas. Más aún, no demostró toxicidad cuando fue dosificada por la vía intravenosa en animales de experimentación. Completando estos resultados, pudo observarse que es rápidamente degradada en fluido gástrico o intestinal simulado. Estos resultados hacen que un estudio de toxicidad subcrónica no sea necesario.

Dado que el evento de soya LiberyLink® es sustancialmente equivalente a su línea de origen (A5547) y a las variedades de soya tomadas como referencia por la literatura y que su comportamiento agronómico y funcional como alimento son similares a estas, no se consideró necesario realizar este tipo de ensayos carcinogénicos y teratológico.

El evento de soya LibertyLink evento A5547-127 es equivalente desde el punto de vista sustancial a su contraparte no genéticamente modificada. Para evaluar si su función como alimento se conserva se realizó un ensayo de alimentación en animales.

En los estudios realizados se alimentaron pollos con soya del evento A5547-127, de su contraparte no transgénica o una variedad comercial y no encontraron diferencias en cantidad de alimento consumido, peso, ganancia de peso o índice de conversión (Leeson, 1998, M-141259-01-1).

c) Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen, cuando haya sido requerido por la autoridad de otro país y se tenga acceso a él. La descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad establecidos deberá incluirse en el estudio.

Como se desprende del inciso anterior, la soya LibertyLink® no representa riesgo alguno para el ambiente, ni para la flora o la fauna. Por lo tanto, se espera que esta soya sembrada sea igual que sus progenitores y por consiguiente segura.

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, así como las consideraciones socioeconómicas que existan respecto de la liberación de OGMs al ambiente. Estos análisis deberán estar sustentados en evidencias científicas y técnicas, en los antecedentes sobre uso, producción y consumo, y podrán ser considerados por las Secretarías competentes como elementos adicionales para decidir sobre la liberación experimental al ambiente, y consecuentes liberaciones al ambiente en programa piloto y comercial, respectivamente, del OGM de que se trata.

Lo expuesto anteriormente en cumplimiento a todos los requerimientos es la base para solicitar este permiso, considerándose el material de suficiente confiabilidad y validez científica elaborada en sus diversas etapas por Bayer CropScience.

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, al menos para su liberación experimental, traducida al español. La Secretaría competente, de considerarlo necesario, podrá requerir copia simple de la legislación aplicable vigente en el país de exportación traducida al español

El producto vendría de Estados Unidos y ahí se encuentra con autorización, por lo cual sírvase encontrar la copia de la carta de FDA, apostillada y traducción. Asimismo, con fecha del 22 de julio de 2013, en respuesta al requerimiento expedido el 25 de junio del mismo año para la solicitud de permiso de liberación al ambiente en etapa experimental presentada el pasado 19 de junio de 2013, con número de entrada 038_2013, se ingresaron dichos documentos EN ORIGINAL.

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.

El evento de soya LibertyLink® A5547-127 incorpora la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio como herramienta para control de las malezas conservando las características agronómicas y nutricionales del cultivo, el que es completamente equivalente desde el punto de vista sustancial y nutricional a su línea de origen no genéticamente modificada.

Se espera que el OVGM en cuestión mejore el desempeño de su homólogo convencional:

- La soya tolerante al glufosinato de amonio (herbicida Liberty®) trabaja en conjunto con un sistema de control de malezas diseñado para soya, con características favorables y seguras para el medio ambiente.
- El sistema combina un herbicida no selectivo de amplio espectro, Liberty® (cuyo ingrediente activo es el glufosinato de amonio) con variedades de soya que tienen una tolerancia al herbicida Liberty® incorporada por ingeniería genética. Esto permite un control de malezas a través del uso del herbicida glufosinato de amonio, simplificando el mismo y proveyendo una alternativa al uso del herbicida glifosato.

Los hallazgos significativos de la evaluación ambiental del USDA sobre el evento de transformación A5547-127 incluyen algunos puntos que se señalan a continuación:

- No se exhiben propiedades de patogenicidad vegetal.
- No es más probable que este evento se convierta en maleza en relación con las líneas de soya desarrolladas por mejoramiento convencional de plantas.

- Las características físicas y la susceptibilidad a plagas fueron comparadas con los atributos de la soya no transgénica durante las evaluaciones a campo y no se observaron diferencias obvias con respecto a la cantidad de semilla producida, características de germinación, stand final o susceptibilidad a patógenos.
- Es muy improbable que se aumente el potencial de maleza de cualquier otra especie por inter cruzamientos.

- No se encontraron impactos en organismos no blanco, incluyendo especies amenazadas y en peligro u organismos benéficos.

VII. Número de autorización expedida por SALUD cuando el OGM tenga finalidades de salud pública o se destine a la biorremediación. En caso de no contar con la autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente anexa a un escrito libre, en el que se indique el número de autorización;

No aplica.

VIII. La propuesta de vigencia para el permiso y los elementos empleados para determinarla.

Se solicita el permiso para el ciclo agrícola Primavera-Verano, en apego a las específicas fechas de siembra establecidas por las autoridades correspondientes estatales de SAGARPA, en las zonas agrícolas aplicables.

Este periodo incluye actividades previas a la siembra de soya tales como planeación de los estudios a realizar e importación de la semilla, el ciclo agrícola hasta la cosecha (seis meses) y seguimiento al momento y después de la cosecha.

Referencias.

Bayer, E. et al. 1972. Phosphinothricin and phosphinotrhicyl-alanyl-alanine. Helvetica Chimica Acta, Vol. 55, Fasc 1, N° 25.	M-117813-01-2
Berghman S., De Beuckeleer M. 2002a. Determination of inserted transgenic sequences in Glycine max elite event A5547-127. Aventis CropScience N.V. Internal Report. 29 pages.	M-199536-03-1
Capt 2012b. PAT protein from pat gene - Epitope homology and N-glycosylation searches. Bayer CropScience. Internal report	M-217013-06-1
Capt A. 2012a. PAT/*pat* protein amino acid sequence homology search with known toxins. Bayer CropScience. Internal report	M-266573-05-1
Capt A. 2007a. Assessment of the toxicity and allerginicity of the PAT protein (*pat* gene). Bayer CropScience Internal Report. 63 pages.	M-142779-04-1
Christou, P. 1988. Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles. Plant Physiology 87:671-674	M-204364-01-1
De Beuckeleer M. 2002. Analysis of the nature of the flanking sequences from Glycine	M-217836-01-1

max event A5547-127 Bayer CropScience NV. Internal Report. 22.	
De Beuckeleer M. 2004a. Description of the base pair sequences of the pat gene. Bayer BioScience NV. Internal Report. 5 pages. #C040035	M-228121-01-1
De Beuckeleer M. 2004b _PAT. Description of the amino acid sequence of the PAT protein encoded from the pat gene. Bayer BioScience NV. Internal Report. 5 pages. #C040027	M-135134-03-1
De Beuckeleer M. 1998. Molecular Demonstration of the Stability of the Integration of Glycine max Transformation Event A5547-127 Plant Genetic Systems NV. Internal Report ID Stability Analysis. 13 pages.	M-183196-01-1
De Pestel K., Tanghe S. 2007 Bioinformatics analysis of the pre-insertion locus of Glycine max transformation event A5547-127. Bayer BioScience NV. Internal Report. 38 pages.	M-296123-01-1.
De Wulf A., De Pestel K. 2007. PAT protein contents in leaf, stem and root tissues throughout the life cycle of the glufosinate tolerant soybean event A5547-127. Bayer BioScience NV. Internal Report. 35 pages.	M-293325-01-1
Douglass, 1996.. Recommended compositional and nutritional parameters to test in soybean	M-143563-01-1
FAO. Soybean Statistics. 2013.	M-295548-04-1
Freyssinet M. 2002a. General description of the bacterial gene pat and its gene product PAT as used for producing plants with a genetically-based tolerance to Liberty® Herbicide. Bayer CropScience. Internal Report. 24 pages. #C025020	M-208497-01-1
Freyssinet M. 2002c 2002b M-208502-01-1. Agronomic performance of Glufosinate tolerant soybean Events A2704-12 and A5547-127 In the 2000 Brazil production season. Bayer CropScience. Internal Report. 14 pages. #C025022.	M-208502-01-1
Hérouet C., Esdaile, D., Mallyon, B., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis, R., Rouan, D. 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 (2005) 134-149.	M-247779-01-1
Hymowitz 1970. On the domestication of the soybean. Economic Botany. Vol 4., Issue 4 P 408-421.	M-261917-01-1
Kakade et al., 1972 .Biochemical and nutritional assessment of different varieties of soybeans	M-183138-01-1
Kowite W. 2008. Comparative Assessment of Morphological and Agronomic Characteristics of Glufosinate-tolerant Soybean A5547-127, USA, 2006-2007. Bayer CropScience. Internal Report. 45 pages	M-295867-02-1
Leeson S. 1998. The effect of Glufosinate resistant soybeans (A5547-127) on the growth of female broiler chickens. University of Guelph. 13 pages.	M-141259-01-1
Liener, 1994. IImplications of antinutritional components in soybean foods.	M-204382-01-1
Messina y Barnes, 1991. Commentary The role of soy products in reducing risk of cancer	M-204379-01-1
Moens, 2012. Full DNA sequence of the transgenic and pre-insertion locus of Glycine max transformation event A5547-127. Report BB10-006. 46 pages	M-452853-01-1
Moens 2012 . Description of Vector pB2/35SacK. Aventis CropScience Gent. Internal Report ID pB2/35SAcK-03. 10 pages. #C020823	M-143015-04-2
Oberdoerfer R. 2012. Nutritional Impact Assessment Report on Glufosinate Ammonium Tolerant Soybean Transformation Event A5547-127	M-360323-02-1
OECD 1993. Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role of Modern Biotechnology. Organization for Economic Co-operation and Development. 237 pages. #A67319	M-254383-01-1
OECD 2000. Concensus Document on the biology of Glycine max (L.) Merr.	M-201734-02-1

(Soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15. Organization for Economic Co-operation and Development. 22 pages. #C011910	
Rackis, 1974. Biological and physiological factors in soybeans	M-204371-01-1
Rascle J. 2009a. PAT/pat protein. Heat stability study. Internal Report Study SA09050. 34 pages.	M-131221-04-1
Rascle 2009b. In vitro digestibility studiy in human simulated gastric fluid. Internal Report SA09048. 40 pages.	M-214025-04-1
Rascle 2009c. In vitro digestibility studiy in human simulated intestinal fluid. Internal Report SA09048. 37 pages.	M-214021-03-1
Servicio de información agrícola y pesquera (SIAP). En línea. Disponible: http://www.siap.gob.mx/	
Shilito R. 2001. Reproductive Biology Data – Group 5 (Event A5547-127) Glufosinate tolerant Soybean. USA. 2000. BayerCropScience. Internal Report 21 pages.	M-238822-01-2
Shillito R. 2003 Phosphinothricin Acetyltransferase content of Processed Fractions of Group 5 (Event A5547-127) Glufosinate-tolerant Soybean, USA, 1999.Final Report. Bayer CropScience. Internal Report. 44 pages.	M-238895-02-1
Shutt, D.A. 1976. Effets des oestrogenes vegetaux sur la reproduction animale.	M-204367-01-1
Van Wert S. 2009. Mendelian Inheritance and Agronomic Performance of Event A5547-127. AgrEvo USA Co. Internal Report. 30 pages.	M- 181487-03-1