Bayer CropScience

SOLICITUD DE PERMISO PARA LA LIBERACIÓN AL AMBIENTE

DEL ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO

GLT: GlyTol® TwinLink™

(GHB614 x T-304-40 x GHB119)

EN ETAPA EXPERIMENTAL

EN LOS ESTADOS DE BAJA CALIFORNIA Y SONORA

DURANTE EL CICLO AGRICOLA 2015.

1. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DE QUIEN PROMUEVE

Bayer de México S.A. de C.V.

División CropScience

BME820511SU5

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
E-Mail: **bitia.osorio@bayer.com**

Ing. Nicolas Diaz
Tel. 5728 3000 Ext 2726
Tel cel: 55 54331797
Email: **nicolas.diaz@bayer.com**

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

M. en C. Nahum Torres Arredondo
Tel. 5728 3000 Ext 2770
Tel cel: 55 6111 6061
E-Mail: **nahum.torres@bayer.com**

Ing. Salvador de la Cruz Epigmenio
Tel cel: 55 6066 5801
E-Mail: **salvador.delacruz@bayer.com**

Otras personas involucradas en las pruebas de campo y que tengan capacidad de decisión sobre éstas
Ing. Abraham Sandoval Rodríguez
Tel. 5728 3000 Ext 2744
Tel cel: 55 32325700
E-Mail: **abraham.sandoval@bayer.com**

Personas que desarrollaron el producto y que pueden ampliar la información

Linda Trolinder Ph.D. Cotton Development Manager
Tel.: +1 806 7658844
E-Mail: linda.trolinder@bayer.com

Currículum Vitae DE LOS INVOLUCRADOS EN LA LIBERACIÓN DEL OGM.

IBQ. Bitia Osorio Trejo – Gerente de Seeds México y Centroamérica.

A partir de 2004 ha trabajado en Regulación de Agroquímicos de acuerdo a la normatividad mexicana, los primeros tres años en la COFEPRIS-SSA 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 (Seeds) 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 Negocio Seeds México y CA. Mayo 2014.
- Gerente de Regulación en Biotecnología: Bayer de México S.A. de C.V., división CropScience. Agosto 2010 – 2014.
- 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.

Nicolas Diaz - Gerente de Regulación Seeds & Traits.

Cuenta con experiencia en regulación de biotecnología y agroquímicos por más de 16 años en procesos de stewardship, registros, permisos para siembra, monitoreo de resistencia de insectos, evaluación y avance de variedades de algodón y soya biotecnológicos. Ha trabajado en la Dirección General de Sanidad Vegetal como Asesor Técnico de Registros de Agroquímicos y Productos Biotecnológicos, en la compañía Monsanto Comercial, S.A. de C.V. como Coordinador de Registros de Agroquímicos y Biotecnología y como Gerente de Tecnología de Cultivo (algodón, sorgo, soya), actualmente se desempeña como Gerente de Regulatorio para Biotecnología en la compañía Bayer de México, S.A. de C.V.

Formación Académica

- Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 1995.

Experiencia Profesional

- Gerente de Regulatorio para Biotecnología. Bayer de México, S.A. de C.V. 2014
- Gerente de Tecnología de Cultivo – Algodón, Sorgo Soya. Monsanto Comercial, S.A. de C.V. 2007 - 2013
- Coordinador de Registros de Agroquímicos y Biotecnología. Monsanto Comercial, S.A. de C.V. 1998 – 2007
- Asesor Técnico de Registros de Agroquímicos y Productos Biotecnológicos. Dirección General de Sanidad Vegetal. 1996 – 1997.

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

Con una experiencia de 20 años en regulación de agroquímicos. Trabajó dentro de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en regulación de insumos fitosanitarios y posteriormente con la empresa Cuproquim de México. En otros periodos como Consultor Externo con empresas como Chemtura o Cheminova. Asimismo, fue Gerente del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Distrito Federal y también Gerente de Regulación en Sumitomo de México. Ha trabajado también como Inspector en Origen en E.E.U.U. y como asistente de investigación en Alemania. Recientemente fue Gerente de Fitosanidad para el cultivo de *jatropha* en la península de Yucatán.

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

- Gerente de Fitosanidad en jatropha en la península de Yucatán. 2011-2013
- Asistente de laboratorio en investigación en la Universidad de Würzburg. Alemania. 2007-2010.
- Gerente de Regulación en Sumitomo. 2006.
- Gerente técnico en el Comité Estatal de Sanidad Vegetal. 2005-2006.
- Consultor Externo en regulación de agroquímicos con Cheminova y Chemtura. 2004-2006
- Secretaria Técnica en la DGSV durante Feb-Nov 2003.
- Inspector en Origen en E.E.U.U. durante 2001.
- Especialista de registros en Cuproquim de México. 1995-1999

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 BioScience
Asesor Técnico de Servicios

- Coordinación en campo de los ensayos de algodón establecidos para su desarrollo.
- 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.

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

- Sustentar criterios de control y erradicación de plagas.
- Desarrollo e implementación de sistemas de Bases de Datos
- Capacitación del personal técnico en los estados para la toma de datos en campo.

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

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

El evento de transformación GlyTol® Twin Link, identificador OECD número **BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8**, el cual en lo sucesivo será denominado GLT o bien GlyTol® Twin Link por simplicidad. El algodón GLT porta los genes *cry1Ab* y *cry2Ae*, los cuales le proporcionan protección contra el ataque de insectos lepidópteros y los genes *bar* y *2mepsps* los cuales le confieren tolerancia a la aplicación de los herbicidas Glufosinato de Amonio y Glifosato, respectivamente.

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

Se efectuó una revisión sobre la distribución del algodón en México, la cual se complementó mediante la investigación del material conservado en el "Herbario Nacional, MEXU" del Instituto de Biología de la UNAM. Esto permitió que la información sobre la distribución de las especies del género *Gossypium* pudiera ampliarse notablemente. Lo anterior puede observarse en el cuadro y mapa presentados a continuación:

Tabla 1. Distribución de especies de *Gossypium* en México

Especie	Ubicación Estado: Localidades y/o Municipios
G. aridum	**Oaxaca:** Tehuantepec, Guiengola, SE de la Ventosa hacia Niltepec, Sante María Huatulco y Juchitán. **Guerrero**: Acapulco, SE de San Luis, San Pedro y La unión. **Michoacán**: Villa Victoria, Huacana, Arteaga y cerca de la presa El Infiernillo. **Colima:** Ixtlahuacan y Tecomán. **Jalisco:** Chamela, Autlán, Hostotipaquillo, Tomatlán, La Huerta y Barra de Navidad. **Nayarit:** Nayar, Jesús María, ribera del Río Santiago, Tepic, Pochichitlan y Agua Milpa. **Sinaloa:** Mocorito, El Caimanero, Rancho Viejo, Cofradia y Culiacán. **Veracruz:** Actopan.

	Puebla: Tecomatlán, Jolalpan, San Pedro de las Palmas, Tecuautitlán San Martín.
G. armourianum	**Baja California:** Golfo de California e Isla San Marcos.
G. davidsonii	**Baja California:** Arroyo Salado, ribera del Río La Purísima, Sierra de la Giganta, Los Cabos, Santa Anita y La Paz. **Sonora:** Guaymas.
G. gossypioides	**Oaxaca:** Santa Ana, Xishilo Cuicallán, San Bartolo Yautepec, Tlacolula y Tehuantepec.
G. harknessii	**Baja California:** Cieneguita, Isla Margarita, Isla Montserrat, Loreto, La Paz, Isla Coronado, Isla del Carmen y Agua Grande.
G. hirsutum	**Baja California:** La Paz e Isla Socorro. **Campeche:** Xpujil, Champotón, Palizada, Constitución y Campeche. **Chiapas:** Acala, San Nicolas, Palenque y Ocosingo. **Guerrero:** Acapulco y Río Barbulillas, Zihuatanejo. **Jalisco:** San Martín de Bolaños, San Martín Hidalgo, La Huerta, Autlán y Malaque. **Michoacán:** Tzitzio, Lázaro Cárdenas y Plan de Guadalupe. **Morelos:** La Mezquitera y Xochitepec. **Nayarit:** Tepic. **Oaxaca:** Yautepec, Juchitán, San Mateo del Mar, Pochutla, Tehuantepec y Mitla. **Puebla:** Las Adelfas, Acatlán y San José Miahuatlán. **Querétaro:** Cadereyta y Peña Miller. **Quintana Roo:** Cobá, Divorciados, Laguna Guerrero, Huaymax y Felipe Carrillo puerto. **San Luis Potosí:** San Antonio. **Sinaloa:** Playa Mazatlán. **Tabasco:** Tacobal, Balancán y Ciudad Carmen. **Tamaulipas:** Soto La Marina, Punta Esterillas y Las Enramadas. **Veracruz:** Paso de Ovejas, Coatzintla e Hidalgotitlán. **Yucatán:** Celestún, Yaxcabá, Uxmal, Telchak, Chelem, Chuburná y Playa Progreso.
G. lanceolatum	**Baja California:** Isla Socorro. **Guerrero:** Acapulco, José Azueta, Coyuca de Benítez, Coyuca de Catalán y Zihuatanejo. **Colima:** El Huerto e Isla Socorro.

G. laxum	**Guerrero:** Chilpancingo, Zumpango del Río y al oeste de Milpillas.
G. lobatum	**Colima:** Coquimatlán. **Guerrero:** Acapulco.
G. thurberi	**Chihuahua:** Madera y El Lago **Sonora:** Río Bavispe y Hasabas, Horconcitos, Benjamin Hill, Magdalena, Yecora e Himuris.
G. trilobum	**Jalisco:** Oblatos al norte de Guadalajara. **México:** Polotitlán y Valle de Bravo. **Michoacán:** Benito Juárez. **Morelos:** Yautepec y Cuernavaca. **Oaxaca:** Chiquihuitlán de Benito Juárez.
G. turneri	**Sonora:** Guaymas y Bahía San Pedro al sur de Hermosillo
G. barbadense	**Baja California:** La Paz. **Guerrero:** Chilapa, Malinaltepec e Ixcareopan. **México:** Acatitlán, Temascaltepec. **Puebla:** Yancuictlalpan, Cuetzalan. **Sinaloa:** Culiacán, San Ignacio, Ajoya. **Tabasco:** Paraiso. **Veracruz:** San Lorenzo, Coatepec y Catemaco. **Yucatán:** Telchac, Puerto.

Fuente: Fryxell (1979) y Colección del Herbario Nacional "MEXU" (1998), del Instituto de Biología de la UNAM.

Figura 1. Mapa de distribución generado por la consulta a Fryxell (1979) y colección del Herbario Nacional "MEXU" (1998), del Instituto de Biología de la UNAM.

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 se describen ampliamente en este mismo punto, y que fueron realizadas para el género *Gossypium* en todo el país. Además se generó un mapa de distribución de dichas colectas que muestra y corrobora la información anterior (Fryxell, 1979 y MEXU, 1998), que indica que no existe una distribución de especies relacionadas con el algodón cultivado en la región del Valle de Mexicali – San Luis Río Colorado y Sonora, y mucho menos aún en las áreas dedicadas al cultivo del algodonero en la región de donde se encuentran incluidas las áreas donde se pretende sembrar el algodón GlyTol® Twin Link con protección contra los insectos lepidópteros y tolerante a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato.

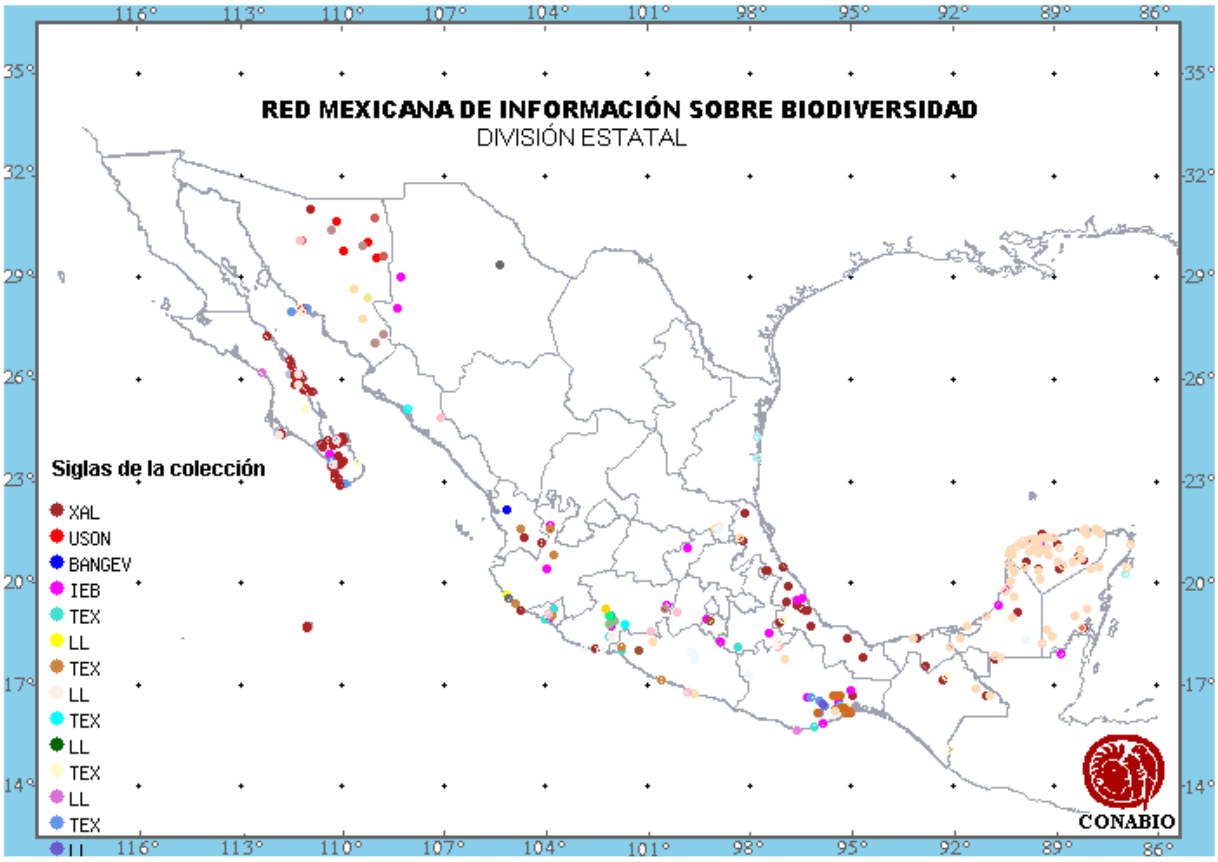


Figura 2. Mapa de distribución generado por la consulta al REMIB en la página de la CONABIO (2006)

I.c Especificación de la existencia de especies sexualmente compatibles

No existen especies sexualmente compatibles con el algodón en el área de liberación propuesta.

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

El algodón es como cualquier otro algodón, y requiere de la intervención del hombre para poder persistir. Las semillas *de Gossypium hirsutum* normalmente requieren de alguna forma de tratamiento para asegurar una adecuada germinación: un tratamiento de calor y ácido sulfúrico para eliminar la borra de la cubierta de la semilla. Las semillas que podrían escapar del cultivo durante el transporte de la cosecha no producirán poblaciones persistentes debido a que requieren pre-tratamientos para poder germinar. La necesidad de humedad suficiente también evita que la semilla pudiera escapar. Aún en áreas con alta

precipitación, semillas que escapan no han podido establecerse debido a su baja capacidad de colonización.

Los nuevos rasgos incorporados, la protección contra el ataque de insectos lepidópteros y la tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato no hacen diferente al algodón GLT de su contraparte convencional aparte de presentar las ventajas de controlar a los insectos lepidópteros y de tolerar la aplicación de los herbicidas ya mencionados por lo que podría persistir en el mismo hábitat que su contraparte convencional. Como ya se ha mencionado, la lluvia, la latitud, y la elevación son tres factores dominantes que influencian el clima durante el desarrollo de este cultivo.

Siendo el algodonero una planta tropical, es altamente sensible a temperaturas por debajo de los 10º C, y produce poco o nulo crecimiento a temperaturas por debajo de los 15.6º C. La temperatura óptima para el crecimiento de brotes del algodón es aproximadamente 30º C; para crecimiento de raíces la temperatura óptima del suelo es entre 29.4º C y 35º C. Para mayor información sobre las condiciones climáticas que afectan a esta especie, favor de consultar “Cotton and the Environment” en Hak *et al*., 1996; además “University of California. 1984. Integrated Pest Management for COTTON in the Western Region of the United States”.

I. e Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética

Organismo receptor

Nombre científico:	***Gossypium hirsutum* L**
Familia:	Malvaceae
Género:	*Gossypium*
Especie:	*Gossypium hirsutum* (2n=52, Upland cotton)
Cultivar:	Diversas variedades y líneas de mejoramiento
Nombre común:	Algodón

Organismo donador

El algodón GLT fue producido por medio del cruzamiento convencional de los eventos GlyTol® (GHB614) y TwinLink™ (T304-40 x GHB119). Los organismos donadores son:

Para el evento TwinLink™

El evento TwinLink™ fue a su vez producido por medio del cruzamiento convencional de los eventos T304-40 (gen *cry1Ab*) y GHB119 (gen *cry2Ae*), cuyos genes fueron aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Ambos eventos, T304-40 y GHB119, contienen al gen *bar* como marcador de selección, el cual le confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio al organismo receptor y que fue aislado a partir del microorganismo *Streptomyces hygroscopicus*, cepa ATCC21705 (Murakami *et al*., 1986).

A continuación se muestra la descripción taxonómica de los organismos donadores para los componentes principales del evento TwinLink™:

Para los genes *cry1Ab* y *cry2Ae*

Especie:	***Bacillus thuringiensis***
Género:	*Bacillus*
Familia:	Bacillaceae
Orden:	Bacillales
Clase:	Bacilli
Nombre común:	Bt

Para el gen *bar*

Especie:	***Streptomyces hygroscopicus***
Género:	*Streptomyces*
Familia:	Streptomycetaceae
Orden:	Actinomycetales
Subclase:	Actinobacteridae
Clase:	Actinobacteria
Nombre común:	*Streptomyces hygroscopicus*

Para el evento GlyTol®

El organismo donante de la secuencia del gen *2mepsps* fue el maíz (*Zea mays* L.). El mismo fue generado a través de la introducción de dos mutaciones puntuales en el gen de tipo silvestre *epsps* (*wtepsps*) clonado de maíz (*Zea mays* L.) utilizando técnicas *in vitro*. Estos cambios al gen dieron como resultado la producción de una proteína EPSPS doble mutante (2mEPSPS) que tiene menor afinidad de unión por el glifosato, permitiendo así una suficiente actividad enzimática para que la planta crezca de manera normal en presencia del este herbicida.

Especie:	***Zea mays* L.**
Género:	*Zea*
Familia:	*Poaceae*
Orden:	Glumiflorae
Subclase:	Monocotiledonae
Clase:	Angisopermae
Nombre común:	Maíz

El algodón GlyTol® contiene, además, secuencias de ADN que provienen de *Arabidopsis thaliana* como el promotor del gen *histona H4*, el primer intron del gen II de la variante *histona H3.III* y la región no-traducida 3' del gen *histona H4*, las cuales regulan la expresión del gen *2mepsps*.

I.f País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido

Bayer CropScience ha trabajado en su División de Semillas (Seeds, antes BioScience) para el desarrollo y comercialización de nuevas variedades de algodón resistentes al ataque de insectos lepidópteros y tolerantes a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato. Uno de los logros más importante de este esfuerzo conjunto fue el desarrollo del sistema GLT. La semilla del algodón GLT (que es el nombre del evento apilado que porta los genes que le proveen protección contra el ataque de insectos lepidópteros y que le confieren tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, que es sujeta de la presente petición), será proporcionada por Bayer BioScience (Head Office - FiberMax Cotton), 103 Erskine Street; Lubbock, TX 79403 USA; Phone: 806-765-8844; Fax: 806-765-8876.

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

Las especies silvestres y cultivadas del género *Gossypium* pertenecen a la familia Malvaceae. Este género contiene 50 especies con un número cromosómico básico de 13. De las especies descritas, 45 son diploides (*2n=2x=26*) y se agrupan en siete genomas designados como **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, y **G**. Las especies diploides con los genomas **A, B, E,** o **F** son originarias de África o Asia y se les conoce como especies del Viejo Mundo, las cuales están estrechamente relacionadas. Las especies diploides con los genomas **C** o **G** son originarias de Australia. Las especies diploides que contienen el genoma **D** son originarias del hemisferio occidental y se les conoce como especies del Nuevo Mundo. Los cromosomas en el genoma **D** son más pequeños que los cromosomas de los otros genomas.

Además de las 45 especies diploides, existen cinco especies alotetraploides (*2n=4x=52*) originarias del Nuevo Mundo, de las cuales cuatro son originarias del continente Americano y una de Hawai. Las especies alotetraploides contienen la combinación de los genomas **AADD** y tienen 26 cromosomas largos y 26 cromosomas chicos, aunque existe algún traslape en tamaño entre los cromosomas de los genomas **A** y **D**. El origen genético de las especies alotetraploides fue demostrado experimentalmente cruzando *G. arboreum* (genoma **A**), especie diploide cultivada en la India, y *G. thurberi* (genoma **D**), especie diploide silvestre de América, y duplicando los cromosomas del híbrido estéril con colchicina. El híbrido anfidiploide (**AADD**, *2n=4x=52*) produjo híbridos fértiles cuando fue cruzado con especies tetraploides americanas. Dos especies diploides y dos tetraploides de *Gossypium* son las especies cultivas actualmente:

- *G. herbaceum* L., (*2n=2x=26*) genoma **A**, cromosomas largos,
- *G. arboreum* L., (*2n=2x=26*) genoma **A**, cromosomas largos,
- *G. hirsutum* L., (*2n=4x=52*) genoma **AD**, 26 cromosomas chicos y 26 cromosomas largos, y
- *G. barbadense* L., (*2n=4x=52*) genoma **AD**, 26 cromosomas chicos y 26 cromosomas largos.
- *G. hirsutum* es la principal especie de algodón cultivado y representa aproximadamente el 90% de la producción mundial de fibra y aceite de algodón.

Especies silvestres y distribución:

Lagière (1968) ha agrupado en cuatro grandes grupos a las diferentes especies del género *Gossypium*:

a) Especies silvestres sin fibras, con n=13, comprenden seis secciones:

1. Sección I. Sturtiana: *G. australe, G. sturtii, G. robinsonii*
2. Sección II. Erioxyla: *G. aridum, G. armourianum, G. lobatum, G. harkenessii*
3. Sección III. Klotzchiana: *G. klotzchianum, G. Klotzchianum var davidsonii, G. raimondii*
4. Sección IV. Thurberana: *G. thurberi, G. gossypioides*
5. Sección V. Anomala: *G. triphyllum, G. anomalum*
6. Sección VI. Stoksiana: *G. stocksii, G. longicalyx, G. somalense, G. incanum, G. areisiasum*.

b) Especies cultivadas del Viejo Mundo con n=13.

7. Sección VII. Herbácea. Estas especies poseen flores con brácteas enteras, marcadamente dentadas. Los dientes son, en ocasiones, tres veces más largos que anchos; los filamentos de las anteras cortos, tienen aproximadamente la misma longitud.

Las brácteas que cierran ceñidamente la flor son más largas que anchas, enteras o con tres o cuatro grandes dientes cerca de la parte superior; cápsulas delgadas y alargadas: *G. arboreum* subdividida en seis razas: *burmanicum, cernuum, bengalense, sinense, indicum, sudanense*.

Después de la flor, las brácteas, que se abren ampliamente, son más anchas que largas, el borde superior se parte en seis u ocho dientes. Las cápsulas son redondas o con unos salientes prominentes: *G. herbaceum* subdividida en cinco razas: *persicum, kuljianum, africanum, acerifolium, wightianum*.

c) Especies cultivadas del Nuevo Mundo con n= 26.

Especies de 26 cromosomas que comprenden todas las clases de algodones originarios del Nuevo Mundo y una especie silvestre que se localiza en Hawai.

1. Columna estaminal corta, la superficie de la cápsula es lisa.

Brácteas con dientes largos acuminados, tres veces más largas que anchas, *G. hirsutum*.

Siete razas: *marie-galante, punctatum, palmeri, yucatanense, morrilli, richmondi, latifolium*.

- Raza *punctatum*. Son arbustos de 1-3 metros, muy ramificados, sin predominio del tallo, perennes. La forma típica se localiza en las costas del Golfo de México y en las Antillas.
- Raza *marie-galante*. Son grandes arbustos o arbolitos, pudiendo alcanzar varios metros de altitud, perennes.
- Raza *latifolium*. Los pequeños arbustos, anuales o bianuales, tienen poca o ninguna rama vegetativa. Constituyen el origen de las plantas de algodón "americano" actualmente cultivadas.

2. Columna estaminal larga.

α) Cápsulas grandes (de 3 a 5 cm. o más). La superficie capsular está marcadamente pustulada, finamente algunas veces, con glándulas de aceite en las pústulas. Las semillas tienen una copiosa e igualada capa de fibras.

- Cápsulas con más de 6 cm., ensanchadas por la base: *G. barbadense*.
- Cápsulas con más de 6 cm. más anchas de en medio y estrechas en la base. Semillas soldadas (arriñonadas): *G. barbadense* var. *brasiliense*.

β) Cápsulas pequeñas (de 3 cm. de longitud o menos); la superficie capsular se encuentra finamente pustulada con glándulas de aceite en las pústulas, a menudo lisa a simple vista. Las semillas están recubiertas por una capa de fibras poco abundante e irregular: *G. barbadense* var *darwinii* (Islas Galápagos).

d) Algodón silvestre, con n=26.

Sección VIII. Hirsuta (continuación): *G. tomentosum* (Islas Hawai).

G. hirsutum, ha despertado gran interés en todo el mundo, teniéndose dentro de las variedades corrientes, una clasificación en 16 tipos: Deltapine, Fox, Stoneville (selección de Stoneville Pedegreed Seed Company), Coker 100, Acala, Empire, FiberMax (selección de

Bayer Bioscience Cotton Seed International), Rowden, Mebane Triumph, Western Mebane, Lankart, Paymaster, Macha, Hibred, Delfos, Uplands de largas fibras y Uplands diversas.

I.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 inserci|ón

El algodón GLT fue producido por medio del cruzamiento convencional de los eventos GlyTol® y TwinLink™. En seguida se muestra la información de los eventos que lo originaron.

Para el evento TwinLink™

El evento TwinLink™ fue originado por medio del cruzamiento convencional de los eventos T304-40 (gen *cry1Ab*) y GHB119 (gen *cry2Ae*).

Las secuencias específicas de integración del evento T304-40 fueron determinadas. Estas secuencias contienen 479 bp de secuencia flanco 5', 9056 bp de la secuencia transgénica integrada y 320 bp de la secuencia flanco 3'. La secuencia detallada del evento T304-40, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización se muestran en Moens y De Pestel, 2008. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

De la misma manera, la determinación de la secuencia completa del evento GHB119 muestra 358 bp de secuencia flanco 5', 4302 bp de la secuencia transgénica integrada y 320 bp de la secuencia flanco 3'. La secuencia detallada del evento GHB119, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización se muestran en Verhaeghe y Habex, 2008. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Para el evento GlyTol®

Análisis de PCR fueron conducidos con el uso de pares de primers que amplifican las secuencias flanqueantes 5' y 3' el evento GlyTol® (GHB614). Primers que amplifican secuencias de un gene tRNA del cloroplasto se incluyeron en la reacción y fueron usados como control interno. En una primera reacción de PCR, un par de primers que amplifican las secuencias flanqueantes se usó para demostrar la naturaleza de la secuencia flanqueante. En

una segunda reacción, se demostró la especificidad de los fragmentos de integración 5' y 3'. Los resultados obtenidos de los análisis PCR demostraron que las secuencias flanqueantes 5' y 3' del algodón GlyTol® son de origen de la planta del algodón (Habex y Lecleir, 2006). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

En Van der Klis *et al*., 2006 se presenta una caracterización detallada de la proteina 2mEPSPS y en Habex y Lecleir, 2006 y Habex, 2007 se detalla el locus transgénico. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

I.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

La descripción de las secuencias flanqueantes para ambos eventos, GlyTol® y TwinLink™, se presenta en el inciso anterior. Esta información se presenta en la sección de referencias y es considerada como *INFORMACION CONFIDENCIAL*

TwinLink™

El evento TwinLink™ fue generado por medio del cruzamiento convencional de los eventos T304-40 y GHB119.

Los datos obtenidos a partir de los estudios de Southern blot realizados con el evento de transformación T304-40 demuestran que se integró una copia casi completa del ADN-T dentro del genoma de la planta, flanqueada por una copia incompleta invertida del casete del gen *cry1Ab* y un terminador 3'*me1* adicional. A continuación se muestra el dibujo esquemático del ADN-T como fue insertado en la planta, así como las enzimas de restricción y las sondas utilizadas para el análisis Southern Blot.

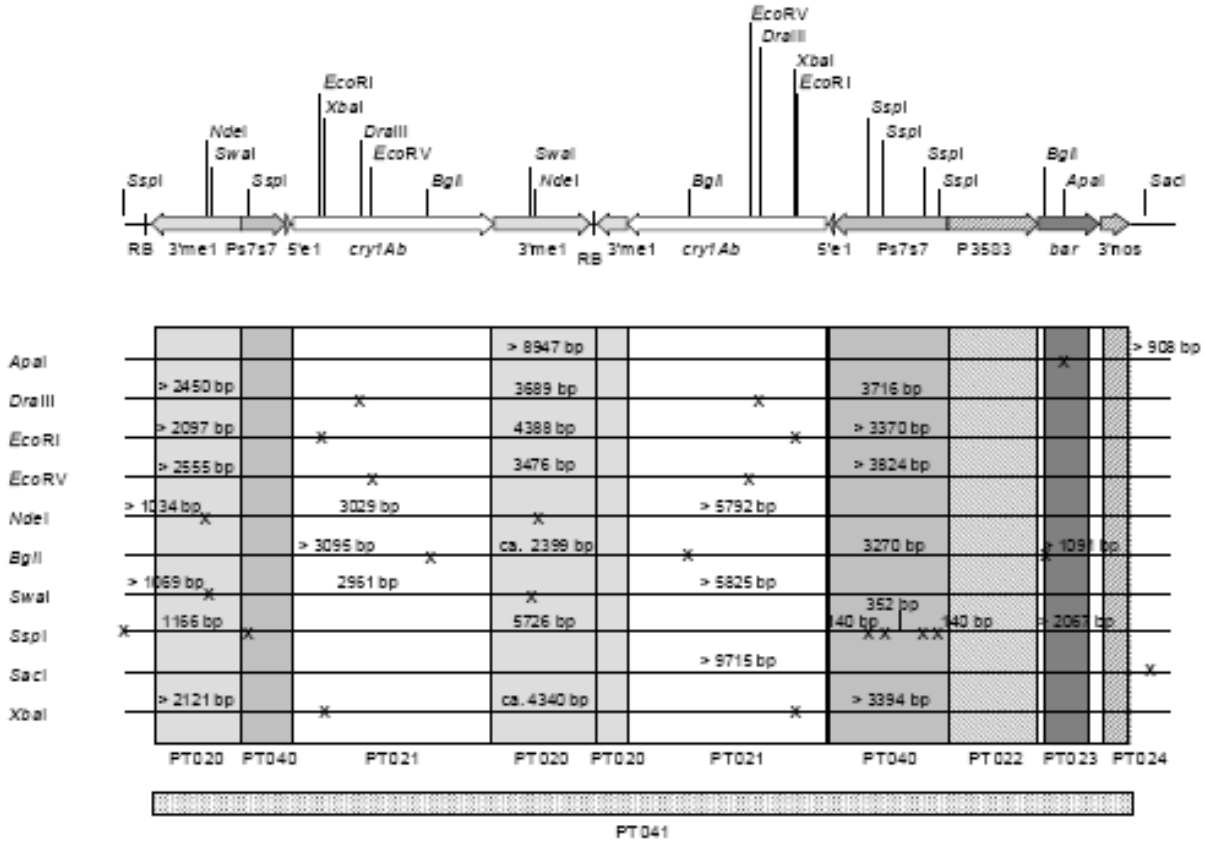


Figura 3. Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento T304-40

En la figura que se presenta a continuación se muestran los resultados del análisis Southern Blot:

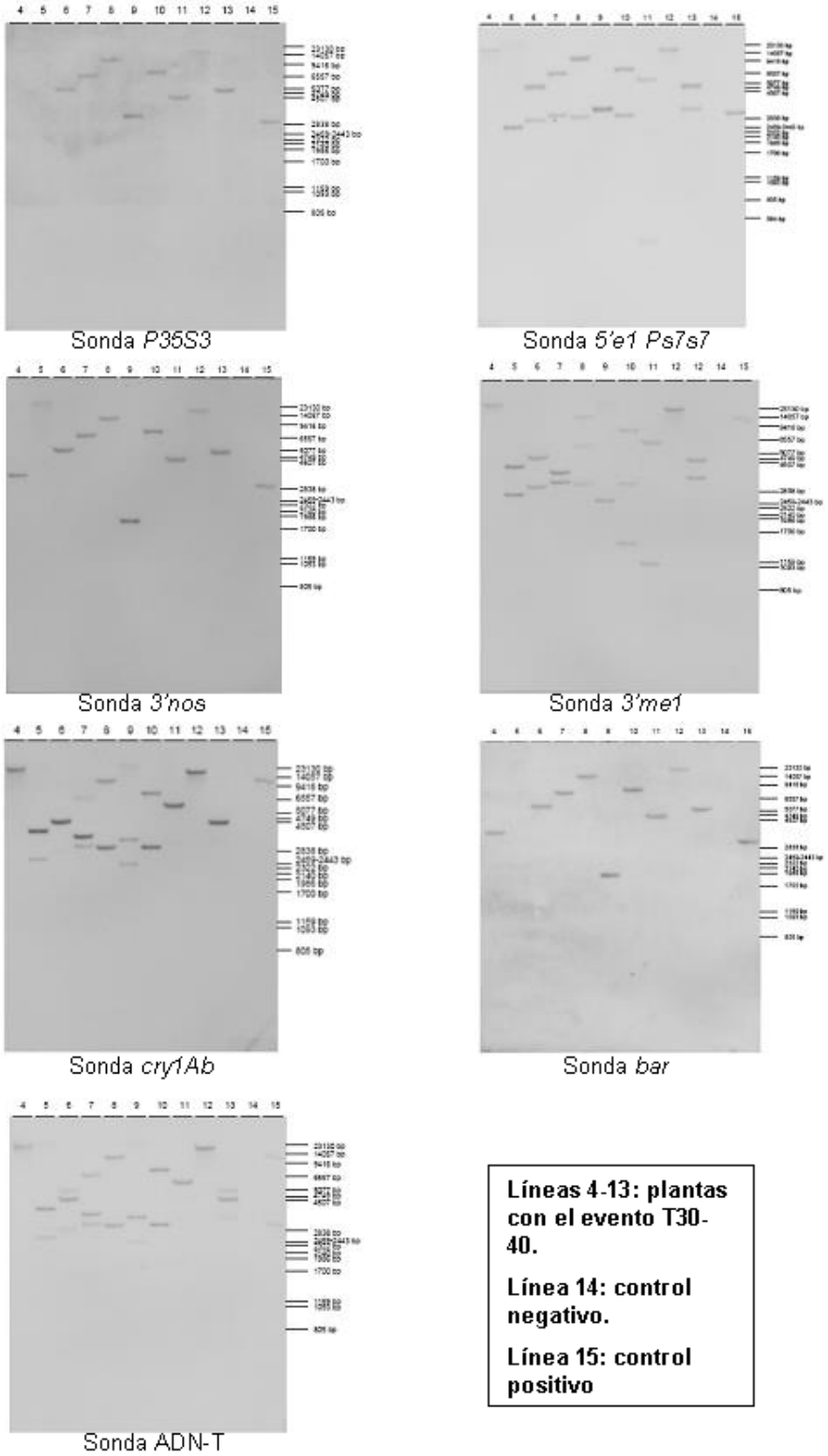


Figura 4. Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis Southern Blot del evento T304-40.

Para el evento GHB119, experimentos de hibridación por Southern Blot demostraron que solamente una copia del ADN-T fue integrada en el genoma de *Gossypium hirsutum* y que el ADN transferido a la planta mantiene la misma configuración original diseñada en el vector de transformación. En seguida se muestra el dibujo esquemático del ADN-T como fue insertado en la planta, así como las enzimas de restricción y las sondas utilizadas para el análisis Southern Blot. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

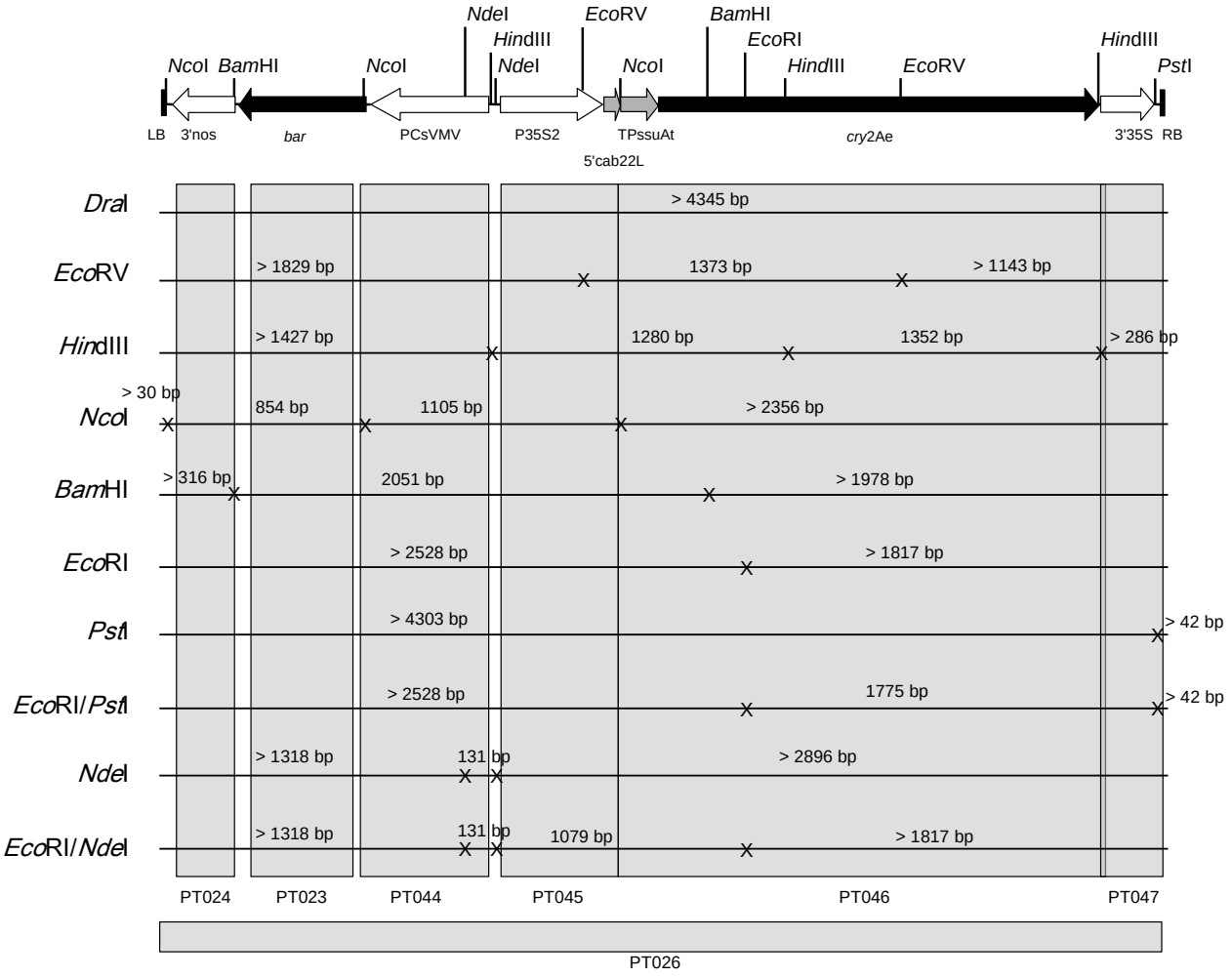


Figura 5. Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento GHB119

En la siguiente figura se muestran los resultados del análisis Southern Blot.

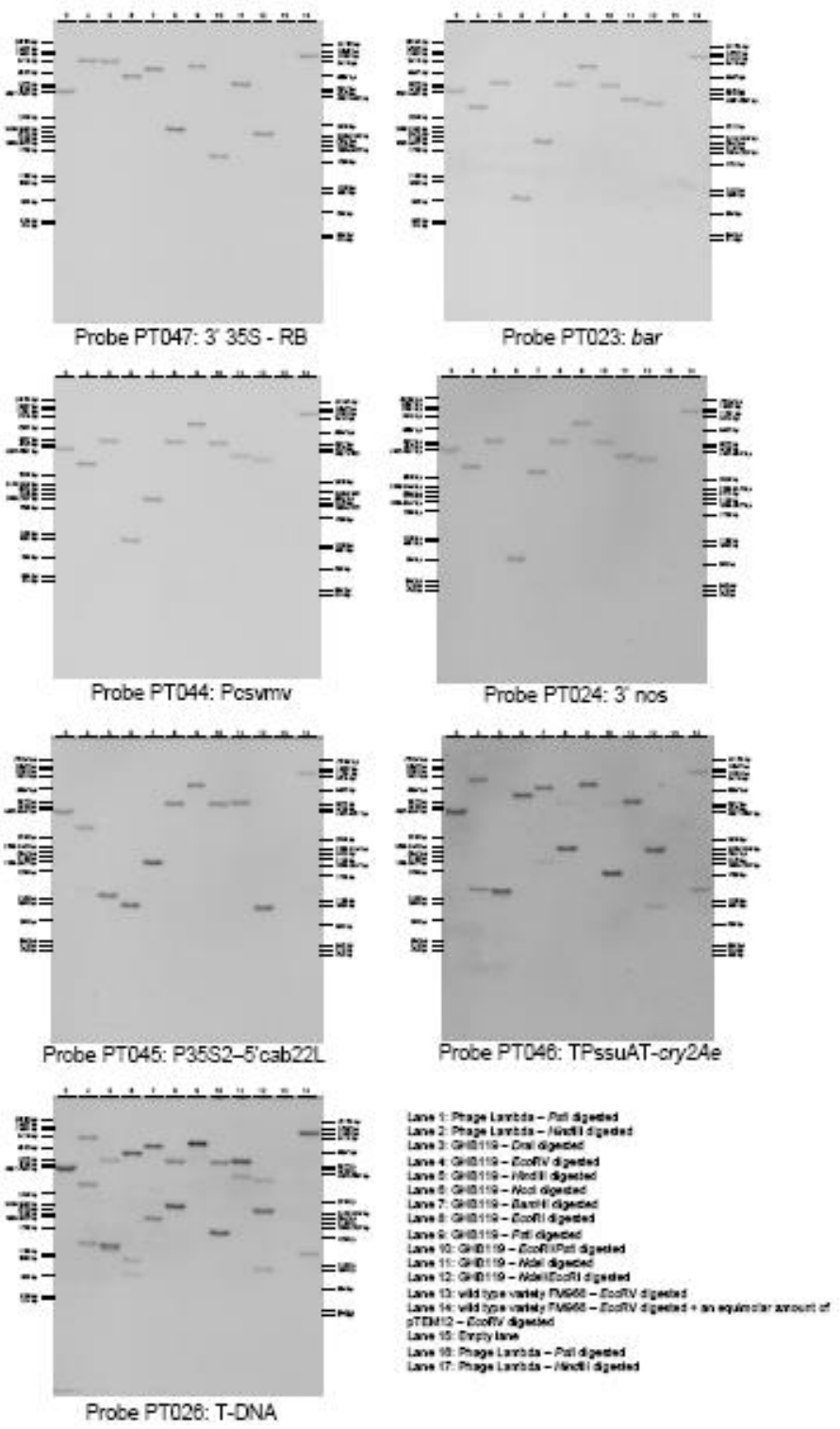


Figura 6. Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis *Southern Blot* del evento GHB119

El algodón TwinLink™ expresa las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae y la proteína PAT, codificada por el gen *bar* que se utilizó como marcador de selección en los eventos T304-40 y GHB119, los cuales dieron origen al evento combinado TwinLink™.

En la siguiente tabla se muestran los contenidos de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™.

Tabla 2. Contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™.

Proteína	Tejido	T304-40	GHB119	TwinLink™
Cry1Ab	Hojas	1.76 ± 0.69	N/A	2.40 ± 1.51
	Cuadros	2.63 ± 0.69	N/A	1.23 ± 0.41
	Grano	0.39 ± 0.32	N/A	0.43 ± 0.23
Cry2Ae	Hojas	N/A	4.98 ± 0.59	41.3 ± 22.0
	Cuadros	N/A	14.9 ±7.60	4.89 ± 1.46
	Grano	N/A	0.12 ± 0.17	0.23 ± 0.21
PAT	Hojas	189 ± 29	13.6 ± 2.1	443 ± 222
	Cuadros	108 ± 39	93.4 ± 48.3	95 ± 23
	Grano	0.67 ± 0.5	0.65 ± 0.54	1.7 ± 0.8

***El contenido de las proteínas es expresado en µg/g peso fresco**

GlyTol®

En el caso del evento GlyTo®l, la secuencia de ADN insertada tiene una longitud de 3991 bp. El inserto esta completamente caracterizado y corresponde a la configuración del ADN como está diseñado en el plásmido pTEM2. Como se muestra posteriormente, sólo una copia del casete génico se integró en el algodón GlyTol® evento GHB614. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

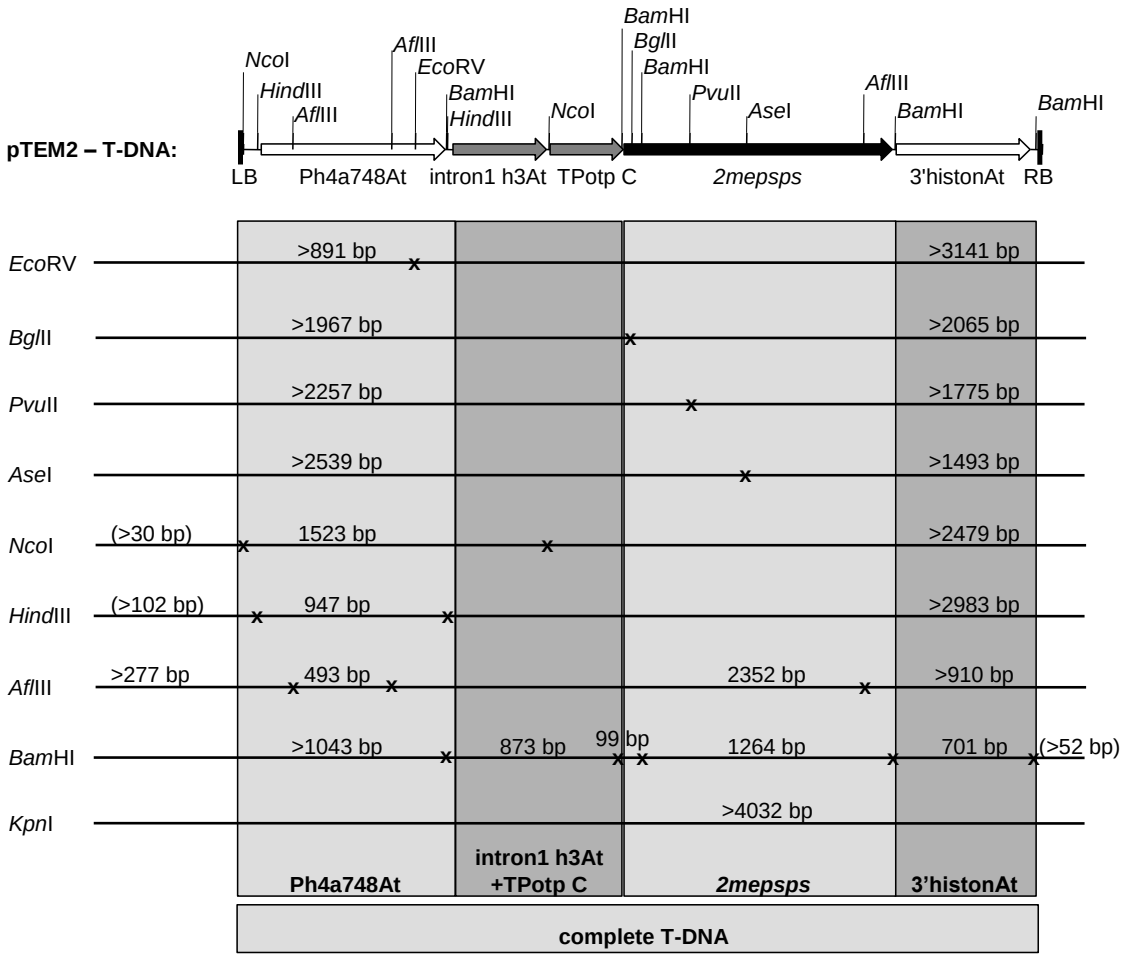


Figura 7. Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento GlyTol® mostrando a estrategia de hibridación

Resultados de Southern blot obtenidos con la hibridación del ADN genómico del algodón evento GHB614 (digerido con *EcoR*V, *Bgl*II, *Pvu*II, *Ase*I, *Nco*I, *Hind*III, *Afl*III, *BamH*I and *Kpn*I) con las sondas Ph4a748At, intron1 h3At+TPotp C, *2mepsps*, 3'histonAt y el ADN-T completo muestran la presencia de un fragmento de integración 5' y un fragmento de integración 3'.

Estos datos demuestran que el ADN trasferido al algodón GlyTol® corresponde a la configuración del ADN como está diseñado en el plásmido pTEM2 y que sólo una copia del casete génico se integró en el algodón GlyTol® evento GHB614. Lo anterior se muestra en la siguiente figura de Southern Blot.

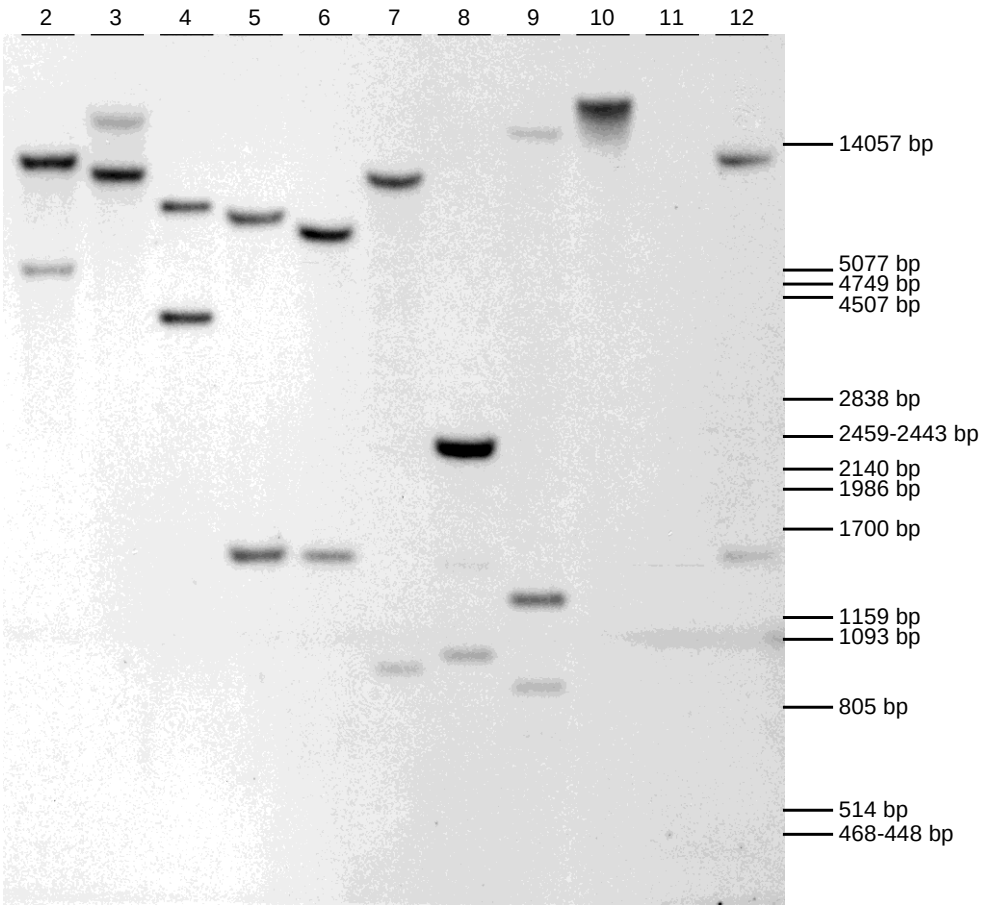


Figura 8. Resultados del análisis Southern Blot del algodón GlyTol® (T-DNA probe).

Línea 2: Algodón GlyTol® – *EcoR*V digerido

Línea 3: Algodón GlyTol® – *Bgl*II digerido

Línea 4: Algodón GlyTol® – *Pvu*II digerido

Línea 5: Algodón GlyTol® – *Ase*I digerido

Línea 6: Algodón GlyTol® – *Nco*I digerido

Línea 7: Algodón GlyTol® – *Hind*III digerido

Línea 8: Algodón GlyTol® – *Afl*III digerido

Línea 9: Algodón GlyTol ®– *BamH*I digerido

Línea 10: Algodón GlyTol® – *Kpn*I digerido

Llínea 11: Control negativo (Coker 312) – *Nco*I digerido

Línea 12: Control negativo (Coker 312) – *Nco*I digerido + 1 copia de pTEM2 - *Nco*I digerido

El algodón GlyTol® expresa la proteína 2mEPSPS. A continuación se muestra la expresión de esta proteína en varios tejidos del algodón:

Tabla 3. Niveles de la proteína 2mEPSPS en tejidos de la planta del algodón GlyTol®

Matriz	Contenidos de la proteína 2mEPSPS (µg/g peso fresco) ± SD [% PTE]			
	Etapa de crecimiento 1	Etapa de crecimiento 2	Etapa de crecimiento 3	Etapa de crecimiento 4
Hoja	11.16 ± 3.73 [0.121]	7.94 ± 2.87 [0.090]	6.52 ± 7.20 [0.385]	0.45 ± 0.22 [0.028]
Tallo	ND	1.94 ± 0.61 [0.062]	ND	1.58 ± 0.96 [0.039]
Raíz	ND	0.99 ± 1.00 [0.074]	ND	4.04 ± 1.71 [0.176]
Cuadros	NA	NA	NA	5.35 ± 0.25 [0.175]
Ápice	ND	ND	ND	5.47 ± 0.22 [0.338]
Polen	NA	NA	NA	0.16 ± 0.00 [0.001]

* ND = No Determinado; NA = No Aplicable

GLT: GlyTol® x TwinLink™

El algodón TwinLink™ fue producido a través de una cruza convencional entre los algodones T304-40 y GHB119. El algodón GLT fue producido por una cruza convencional de los algodones TwinLink™ y GlyTol® (GBH614).

La estabilidad genética del ADN insertado en los algodones T304-40, GHB119, TwinLink™ y GlyTol® fue previamente demostrada. El algodón TwinLink™ obtenido de los genes *cry1Ab* y *bar* en la inserción de ADN del algodón T304-40 y los genes *cry2Ae* y *bar* en una segunda inserción de ADN del algodón GHB119. El algodón GlyTol® contiene el gene *2mepsps* en una inserción de ADN simple. Por lo tanto, el algodón GLT contiene los genes *cry1Ab, cry2Ae, bar* y *2mepsps*.

La tolerancia a glifosato se debe a la expresión del gene *2mepsps* y la tolerancia al herbicida Glufosinato de amonio se debe a la expresión del gene *bar* en el algodón GLT. El algodón TwinLink™ es resistente a diversas plagas de insectos lepidópteros debido a la expresión de los genes *cry1Ab* y *cry2Ae*, por lo tanto el algodón GLT es tolerante a ambos herbicidas y resistente a las mismas plagas de lepidópteros al igual que el algodón TwinLink™.

Para demostrar la estabilidad estructural del algodón combinado GLT, se preparó ADN genómico de 24 plantas individuales. El ADN aislado fue digerido con *EcoRV*. Esta enzima reconoce únicamente las tres inserciones de ADN que contienen los genes *2mepsps*, *cry1Ab-bar* y *cry2Ae-bar*, respectivamente. *EcoRV* genera perfiles de restricción que son

característicos para el ADN insertado en cada uno de los progenitores (T304-40, GHB119 y GlyTol®) y en el algodón GLT. La prueba de ADN de restricción de los progenitores y la cruza con las sondas de ADN marcado apropiadamente que consiste en todo o la mayoría del ADN-T de cualquiera de los genes: *2mepsps* o *cry1Ab-bar* o *cry2Ae-bar* reveló la hibridación esperada de los fragmentos de restricción en todas las muestras analizadas. En conjunto, estos datos demuestran la estabilidad de todas las inserciones de ADN en las plantas de algodón GLT cinco generaciones después de la cruza original.

Todas las muestras de ADN de GLT, T304-40, GlyTol® y Coker 312 dieron los fragmentos esperados de ADN en las pruebas zPCR. Por lo tanto, la identidad de cada planta se confirmó y todas las plantas fueron homocigotos para los respectivos loci genéticos que fueron probados. La interpretación de los datos del Southern Blot se realizó de forma cualitativa. Las conclusiones se basaron en el número de fragmentos de hibridación y el tamaño de los fragmentos.

Se llevaron a cabo análisis Southern Blot sobre el ADN genómico preparado a partir de 24 plantas individuales para demostrar la estabilidad estructural de todas las inserciones de ADN en el evento combinado de algodón GLT. Los análisis mostraron la presencia de los fragmentos de hibridación esperados en todas las muestras de ADN transgénico probado usando sondas de ADN para el DNA-T *2mepsps*, la sonda ADN-T *cry1Ab*, la sonda del gene *cry1Ab* y la sonda ADN-T *cry2Ae-bar*. Así, el ADN insertado *2mepsps*, *cry1Ab-bar* y *cry2Ae* son estables en plantas GLT obtenidas de la cruza de mejoramiento convencional TwinLink™ y GlyTol® cinco generaciones después de la cruza original.

En las siguientes figuras se muestran los resultados del análisis Southern Blot realizado para cada inserto:

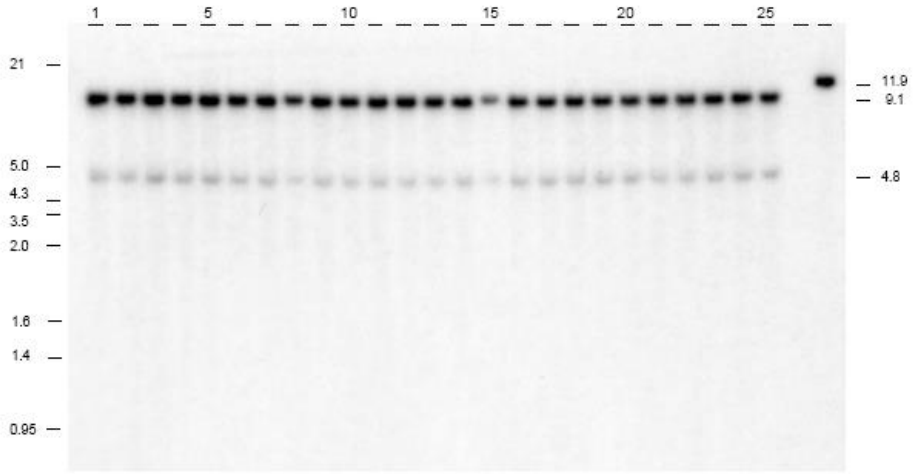


Figura 9. Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *2mepsps* ADN-T

Líneas 1-24: Algodón GLT EcoRV digerido

Línea 25: Algodón GlyTol® EcoRV digerido

Linea 26 control negativo: Algodón WT variedad Cocker 312 EcoRV digerido

Línea 27 control positivo: Algodón WT variedad Cocker 312 +1 copia pTEM2 EcoRV digerido

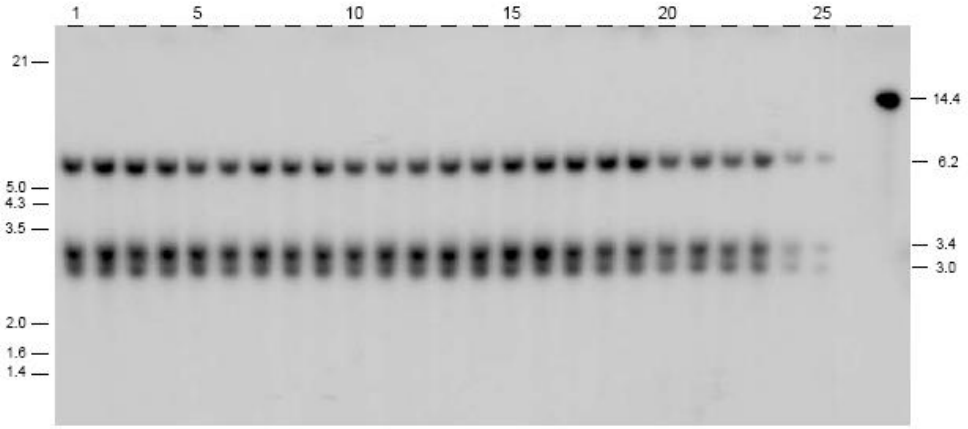


Figura 10. Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *cry1Ab-bar* ADN-T

Líneas 1-24: Algodón GLT EcoRV digerido

Línea 25: Algodón T304-40 EcoRV digerido

Linea 26 control negativo: Algodón WT variedad Cocker 312 EcoRV digerido

Línea 27 control positivo: Algodón WT variedad Cocker 312 +1 copia TDL008 EcoRV digerido

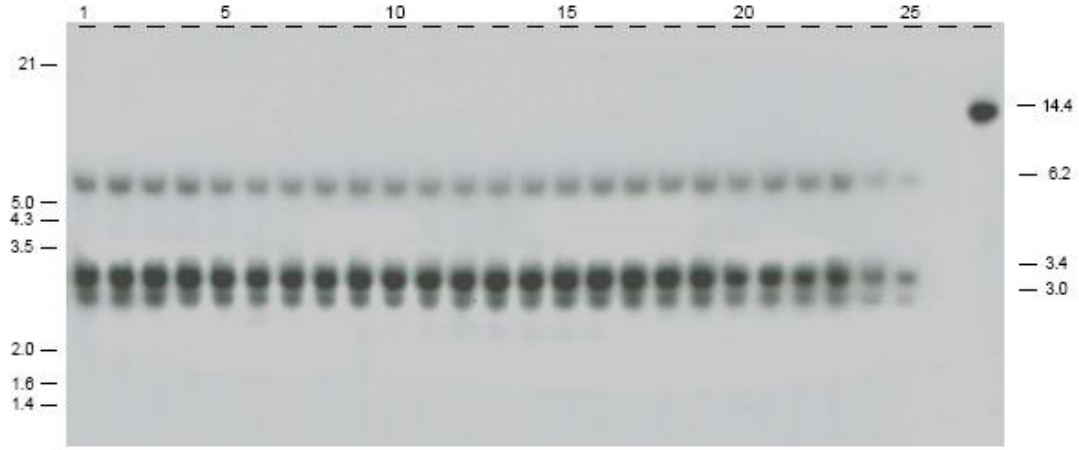


Figura 11. Demostración de la estabilidad de GLT para la sonda del gene *cry1Ab*

Líneas 1-24: Algodón GLT *EcoRV* digerido
Línea 25: Algodón T304-40 *EcoRV* digerido
Linea 26 control negativo: Algodón WT variedad Cocker 312 *EcoRV* digerido
Línea 27 control positivo: Algodón WT variedad Cocker 312 +1 copia TDL008 *EcoRV* digerido

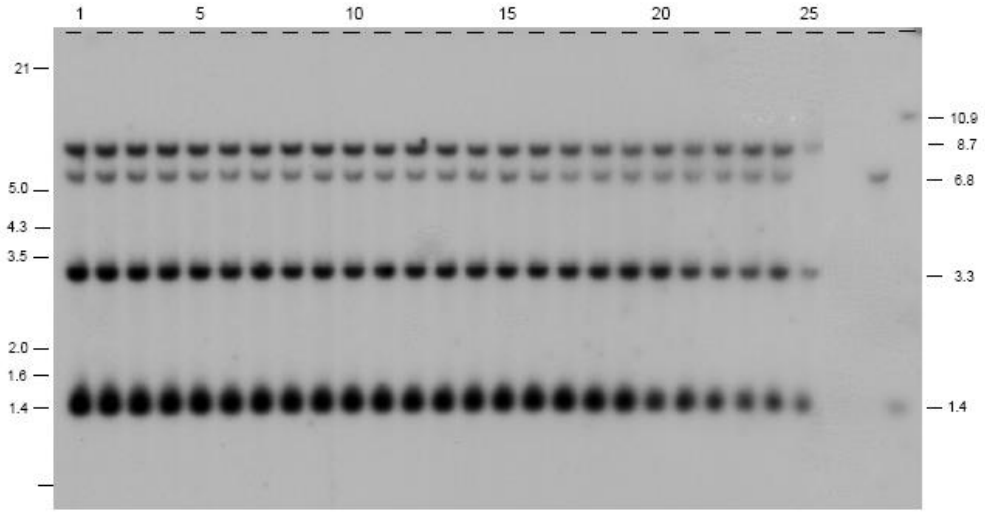


Figura 12. Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *cry2Ae-bar* ADN-T

Líneas 1-24: Algodón GLT *EcoRV* digerido
Línea 25: Algodón GHB119 *EcoRV* digerido
Linea 26 control negativo: Algodón WT variedad Cocker 312 *EcoRV* digerido
Línea 27: Algodón T304-40 *EcoRV* digerido
Línea 28 control positivo: Algodón WT variedad Cocker 312 +1 copia pTDL008 *EcoRV* digerido

I.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

El algodón GLT fue generado por medio del cruzamiento convencional de los eventos TwinLink™ y GlyTol®. Se presenta una descripción para cada evento.

Para el evento TwinLink™

El algodón TwinLink™ fue producido por medio del cruzamiento convencional de los eventos T304-40 (Cry1Ab) y GHB119 (Cry2Ae). Los mapas genéticos de los plásmidos que se utilizaron como vectores para la transformación genética se muestran enseguida.

T304-40: pTDL008

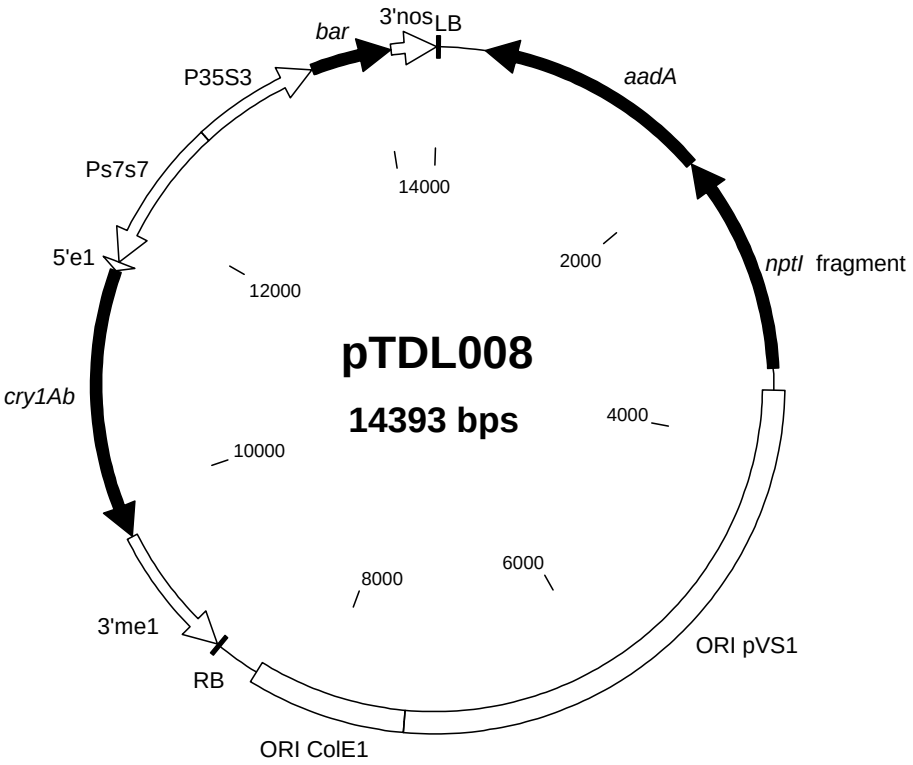


Figura 13. Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008

Tabla 4. Elementos genéticos del vector pTDL008 que fueron insertados en el genoma de la planta

Posición	Orientación	Origen de la secuencia
8767-8791		RB: Repetición del borde derecho del ADN-T de Agrobacterium tumefaciens (Zambryski, 1988)
8792-9728	Counter clockwise	**3´me1:** Contiene la región 3' no codificante del gen de la enzima NADP-malic de *Flaveria bidentis (*yellowtop) (Marshall *et al.,* 1996).
9729-11582	Counter clockwise	***Cry1Ab*:** Secuencia codificante del gen de la proteína Cry1Ab (MetAlaAsp2...Asp616) de *Bacillus thuringiensis berliner* 1715 (Höfte *et al*., 1986).
11583-11643	Counter clockwise	**5'e1:** Contiene la secuencia líder del gen E1 específico del tapetum (*GE1*). (Michiels *et al.,* 1992).
11644-12685	Counter clockwise	**Ps7s7:** Secuencia que incluye la región promotora duplicada derivada del segmento 7 del genoma del virus subterráneo del trébol (clover stunt) (Boevink et *al*., 1995)
12686-13543	Clockwise	**P35S3:** Secuencia que incluye la región promotora del trascripto 35S de CaMV (Odell *et al.,* 1985)
13544-14095	Clockwise	***bar*:** Secuencia codificante del gen fosfinotricin acetil transferasa de *Streptomyces hygroscopicus* descrito en Thompson *et al.* (1987)
14096-14393 1-12	Clockwise	**3´nos:** Secuencia que incluye la región 3' no codificante del gen nopalina sintetasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker *et al.*, 1982)
13-37		**LB:** Repetición del borde izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)

GHB119: pTEM12

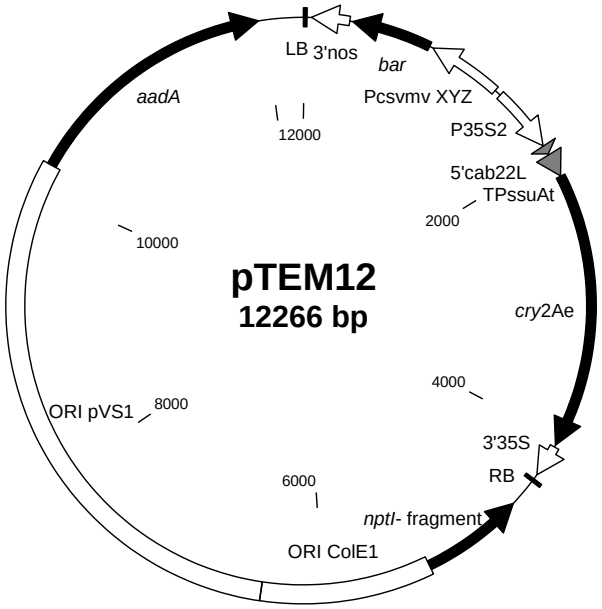


Figura 14. Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008

Tabla 5. Elementos genéticos del vector pTEM12 que fueron insertados en el genoma de la planta

Posición	Orientación	Origen de la secuencia
1-25		**LB:** Repetición del borde izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)
26-335	Counter clockwise	**3'nos:** Secuencia que incluye la region 3' no codificante del gen nopalina sintetasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker *et al.*, 1982)
336-887	Counter clockwise	**bar:** Secuencia codificante del gen fosfinotricin acetyl transferasa de *Streptomyces hygroscopicus* descrito en Thompson *et al.* (1987)
888-1423	Counter clockwise	**Pcsvmv XYZ:** Secuencia que incluye la región promotora del virus en mosaico Cassava Vein (Verdaguer *et al.*, 1996)
1424-1920	Clockwise	**P35S2:** Secuencia que incluye la región promotora del trascripto 35S del virus mosaico de coliflor (Odell *et al.*, 1985)
1921-1990	Clockwise	**5'cab22L:** Incluye la secuencia líder del gen de la proteína de unión a clorofila a/b de *Petunia hybrida* (Harpster *et al.*, 1988)
1991-2155	Clockwise	**TPssuAt:** Secuencia codificante del péptido de tránsito del gen at1 sA de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis thaliana*, descrito en De Almeida *et al.* (1989)
2156-4051	Clockwise	***cry2Ae*:** Secuencia codificante de una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* adaptada al uso de codones de algodón
4052-4320	Clockwise	**3'35S:** Incluye la región 3' no codificante del trascripto 35S de CaMV (Sanfagon *et al.,* 1991)
4321-4345		**RB:** Repetición del borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens* (Zambryski, 1988)

Para demostrar la herencia independiente de los dos eventos en el evento combinado TwinLink™ los resultados de la descendencia F_2 se muestran en la tabla de abajo. Los dos eventos fueron retrocruzados con la variedad convencional de Bayer. En la generación BC_3F_1, los dos eventos fueron combinados y la descendencia de esta F_1 fue analizada por medio de su homocigocidad vía PCR, desarrollada para identificar la cigocidad de cada planta F_2. En las plantas individuales se analizó la presencia o ausencia de los eventos. Se identificaron cuatro genotipos posibles: WT (wild type)/WT, T304-40/WT, GHB119/WT y T304-40/GHB119. Las plantas que fueron detectadas con los dos eventos, T304-40/GHB119, fueron dejadas hasta la madurez y su semilla fue cosechada para realizar más estudios. Estos resultados complementan el análisis de ADN, caracterizando a los eventos individuales y demostrando la estabilidad de los transgenes.

Tabla 6. Análisis de segregación de los eventos independientes en el algodón TwinLink™

Parentales y cigocidad para el locus *bar*	Generación	Proporción	Observado [a]	Esperado	χ^2 [b] calculada
			WT/WT: T304-40/WT: GHB119/WT: T304-40/GHB119		
Plantas hemicigotas Cry1Ab cruzadas con una planta hemicigota Cry2Ae	F_1	1:1:1:1	19:15:25:21	20:20:20:20	2.6

[a] Probado por homocigocidad vía PCR

[b] Asume un modelo de un locus para cada gene. No hubo diferencia significativa (p=0.05) para la prueba de bondad de ajuste χ cuadrada para la hipótesis de un locus. Para rechazar la hipótesis nula, el valor de la χ cuadrada debe ser mayor que 7.815 con tres grados de libertad.

El contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de las plantas de algodón TwinLink™ y los eventos que lo originaron ha sido descrito en el inciso anterior.

Para el evento GlyTol®

El vector pTEM2 conteniendo los elementos genéticos descritos a continuación fue empleado para la generación del evento GlyTol®.

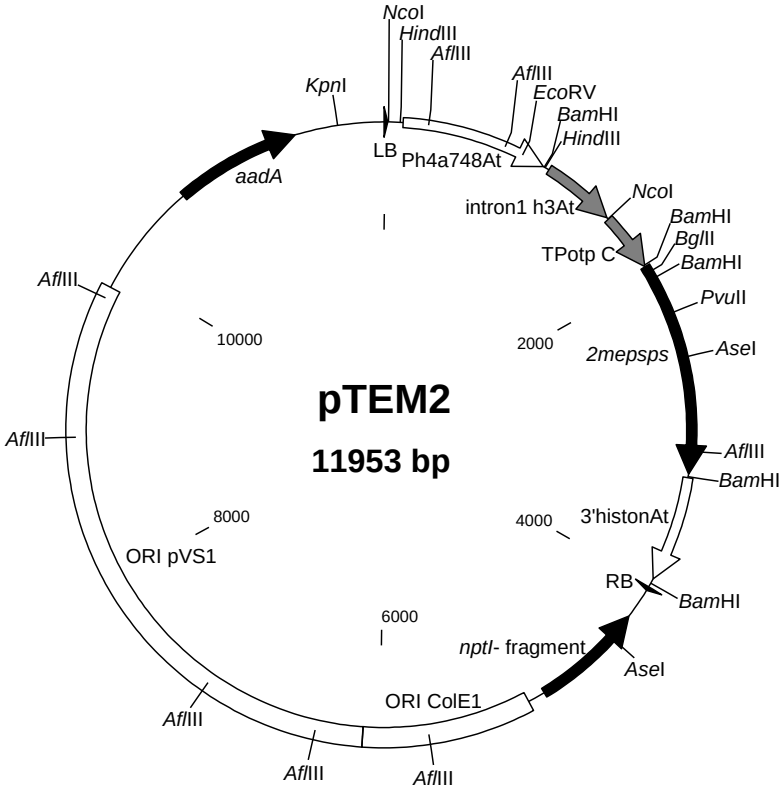


Figura 15. Representación esquemática de la estructura del plásmido pTEM2

Tabla 7. Elementos genéticos del vector pTEM2 que fueron insertados en el genoma de la planta

Elemento genético	Posición en el vector	Elementos genéticos y su función
LB	0001 - 0025	Borde izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)
Ph4a748At	0025 - 1036	Secuencia que incluye la región del promotor del gen *histona H4* de *Arabidopsis thaliana* (Chaboute *et al*., 1987).
intron1 h3At	1037 - 1553	Secuencia que incluye el primer intron del gen II de la variante *histona H3.III* de *Arabidopsis thaliana* (Chaubet *et al*., 1992).
TPotp C	1554 - 1926	Péptido de tránsito optimizado como es descrito en Lebrun *et al.* (1996).
2mepsps	1927 - 3264	Secuencia codificante del gen *doble mutante 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintasa* del maíz (*Zea mays*) (Lebrun *et al*., 2003).
3'histonAt	3265 - 4007	Secuencia que incluye la región no-traducida 3' del gen *histona H4* de *Arabidopsis thaliana* (Chaboute *et al*., 1987).
RB	4008 - 4032	Borde derecho del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)

Asimismo, análisis por medio de la técnica Southern blot demostró la estabilidad del evento GHB614 en el algodón GlyTol® a través de múltiples generaciones y en variedades de diferente origen genético. Datos de segregación (ver tabla abajo) reafirman la estabilidad del inserto y muestran que éste segrega Mendelianamente como un locus dominante.

Tabla 8. Análisis de segregación del Evento de Transformación GlyTol®

Progenitores y cigocidad para el locus *2mepsps*	Generac.	Tasa R:S	Observado R	Observado S	Esperado R	Esperado S	χ^2 calculada[a]
Planta hemicigota BC_2F_1 (línea A convencional), auto-polinizada (*2mepsps*/-)x(*2mepsps*/-)	BC_2F_2	3:1	28 [b]	8	27	9	0.15
Planta hemicigota BC_2F_2 cruzada con la línea convencional B (*2mepsps*/-)x(-/-)	Población "F_1" [c]	1:1	7	9	8	8	0.25
Planta hemicigota auto-polinizada "F_1" (*2mepsps*/-)x(*2mepsps*/-)	Poblaciones "F_2" (agrupadas)	3:1	113	43	117	39	0.60
Planta hemicigota "F_1" cruzada con la línea convencional B (*2mepsps*/-)x(-/-)	Población BC_1F_1	1:1	9	12	10.5	10.5	0.43
Planta hemicigota BC_1F_1 cruzada con la línea convencional B (*2mepsps*/-)x(-/-)	BC_2F_1	1:1	11	6	8.5	8.5	1.47

[a] Asume un modelo de un locus. No hubo diferencia significativa (p=0.05) para la prueba de bondad de ajuste χ cuadrada para la hipótesis de un locus. Para rechazar la hipótesis nula, el valor de la χ cuadrada debe ser mayor que 3.84, con un grado de libertad.
[b] Homocigocidad fue probada por medio de la PCR (19 plantas heterocigotas y 9 plantas homocigotas)
[c] Todo el material de la población "F_1" fue generado usando un transgen hemicigoto como fuente donadora (BC_2F_1).
S=susceptible; R=resistente.

Los niveles de la proteína 2mEPSPS se presentaron en la sección anterior. Se ha demostrado que los elementos regulatorios presentes en el inserto son activos en el meristemo de las hojas verdes (Chaboute *et al*., 1987; Chaubet *et al*., 1992; Lebrun *et al*., 2003). La hoja del algodón recibe la mayor exposición al herbicida glifosato, el cual entonces se acumula en las partes meristemáticas. A partir de esta investigación, se esperaría que el algodón GlyTol® muestre niveles altos de la proteína 2mEPSPS en las hojas y ápices y cantidades menores en los otros órganos. En efecto, el siguiente orden de expresión de la proteína 2mEPSPS fue demostrado:

Hoja, ápice >> raíces, cuadros >> tallos, semillas >> polen

I.k Descripción del método de transformación

Como se mencionó anteriormente, la generación del evento combinado GLT no involucró modificación genética, sino el cruzamiento convencional de los eventos TwinLink™ y GlyTol®.

El evento TwinLink™ fue a su vez generado por medio del cruzamiento de los eventos T304-40 y GHB119. Para la generación de los eventos individuales se transformó tejido de *Gossypium hirsutum* de una variedad Coker 315 con *A. tumefaciens* conteniendo el vector binario pTDL008, para el evento T304-40 y de una variedad Coker 312 con el vector pTEM12, para el vento GHB119. Las plantas fueron regeneradas utilizando un medio apropiado con 500mg/l claforan para eliminar el *Agrobacterium* residual, y luego se seleccionaron con glufosinato de amonio. Los brotes que se desarrollaron fueron transferidos a invernadero, se volvió a probar la tolerancia a glufosinato de amonio y se permitió la floración y producción de semillas.

Similarmente, para la generación del algodón GlyTol® se transformó tejido de *Gossypium hirsutum* de una variedad Coker 312 con *A. tumefaciens* conteniendo el vector binario pTEM2. Las plantas fueron regeneradas utilizando un medio apropiado con 500mg/l claforan para eliminar el *Agrobacterium* residual, y luego se seleccionaron con glifosato. Los brotes que se desarrollaron fueron transferidos a invernadero, se volvió a probar la tolerancia a glifosato y se permitió la floración y producción de semillas.

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

No aplica. Aparte de las secuencias reguladoras no se encuentra alguna otra secuencia incluida en el casete de expresión.

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

El algodón GLT expresa las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT y 2mEPSPS.

La proteína Cry1Ab está determinada por una secuencia de 617 aminoácidos, la cual está codificada por el gen *cry1Ab* cuya secuencia codificada es de 1851 pares de bases (pb).

INFORMACION CONFIDENCIAL

En tanto que la proteína Cry2Ae está compuesta por 631 aminoácidos y está codificada por el gen cry2Ae compuesto de 1893 pb. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

La secuencia de aminoácidos de la proteína PAT (183 aminoácidos) codificada por el gen *bar*, tal como se produce en el algodón TwinLink™, se presenta enseguida. El gen *bar* contiene 552 pares de bases (pb). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Análisis por medio de la técnica Southern Blot de los eventos individuales que generaron al algodón TwinLink™ demuestran que éste porta una copia casi completa del ADN-T dentro del genoma de la planta, flanqueada por una copia incompleta invertida del casete del gen *cry1Ab* y un terminador 3'*me1* adicional para el evento T304-40, y una sola copia del casete de expresión para el evento GHB119. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

En tanto que en el evento GlyTol®, la proteína 2mEPSPS, codificada por el gen *2mepsps*, está constituida por 445 aminoácidos, tal como se muestra enseguida. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

El *gen* 2mepsps está compuesto por 1338 pb y sólo una copia del casete de expresión está integrada en el algodón GlyTol®, tal como lo demuestra los estudios por medio del análisis Southern blot. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

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

En el evento TwinLink™

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 (Bayer *et al*., 1972; Miflin *et al*., 1977; Sadaaki Mase, 1984; Murakami *et al*., 1986; Wild *et al*., 1987; Wendler and Wild, 1990) 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 (De Block *et al*., 1987; Thompson *et al*., 1987). Las plantas que no tienen el transgen pueden ser reconocidas y destruidas usando el herbicida en un estado temprano del desarrollo de la planta. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

No se ha observado ningún efecto en otras rutas metabólicas tal como lo demuestran análisis de semilla y fibra de algodón TwinLink™ en cuanto a su composición. Basado en el análisis estadístico de la información analítica y en la evaluación del impacto nutricional de las diferentes evaluaciones, las semillas y la fibra del algodón TwinLink™ fueron encontradas como equivalentes en su composición y calidad nutricional con relación a sus contrapartes no modificadas. No existe impacto en el valor nutricional en la semilla de algodón debido a la transformación genética (Oberdörfer, 2008). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

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

En el evento GlyTol®

Estudios de la ruta del siquimato condujeron al descubrimiento de la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) por Amrhein *et al*., (1980). El modo de acción del glifosato [N-(fosfonometilo) glicina], un aminoácido análogo sencillo, consiste en la inhibición selectiva de la EPSPS sintasa que es la sexta y penúltima enzima de la ruta del siquimato (Steinrücken y Amrhein, 1980). La reacción catalizada por la EPSPS es la transferencia reversible del fosfoenolpiruvato (PEP, por sus siglas en Inglés) al siquimato-3-fosfato (S3P, por sus siglas en Inglés), conduciendo a la formación del 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSP, por sus siglas en Inglés). La unión del sustrato a la enzima es secuencial, con el S3P uniéndose primero, seguido por PEP (Boocock and Coggins, 1983). La reacción catalizada por la EPSPS procede por medio del rompimiento del puente C-O del PEP (Walsh *et al*., 1996). En plantas cultivadas convencionalmente, la EPSPS es inhibida selectivamente por el glifosato, produciendo su muerte debido a la interrupción de la síntesis de aminoácidos aromáticos y metabolitos secundarios (Steinrücken and Amrhein, 1980).

Desde los 80s, se han hecho varios intentos para identificar y caracterizar variantes de la enzima EPSPS insensibles al glifosato de varios organismos con el objetivo final de generar plantas cultivadas tolerantes al glifosato (Kishore and Shah, 1988). Lebrun *et al*. (2003) seleccionaron un gen doble mutante del maíz, el cual cuando se fusiona a un péptido quimérico de tránsito genera una tolerancia óptima al glifosato en varios cultivos, sin mostrar efectos pleiotrópicos. Este es el gen *2mepsps* que codifica la proteína 2mEPSPS, componente central del algodón GlyTol®.

Evaluaciones del comportamiento del algodón GlyTol® efectuadas por Bayer en los Estados Unidos durante 2004-5 confirman que no hubo modificación en alguna ruta metabólica, ni impacto nutricional como resultado de la transformación genética, con la excepción de que el algodón que porta el gen *2mepsps* es insensible a la acción del herbicida glifosato (Oberdörfer, 2007). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

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

En el evento Twin Link™

El algodón TwinLink™ expresa las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT. Se evaluó de digestibilidad de la proteína Cry1Ab en ensayos con fluidos gástricos simulados (SGF), conteniendo pepsina y a pH 1.2 en tiempos de incubación de 0.5 a 60 minutos (Rouquié, 2007b). Las proteínas de referencia como Cry1Ab fueron incubadas con SGF humana, una solución de pepsina a pH 1.2, aproximadamente a 37°C. Las muestras fueron analizadas en busca de fragmentos de proteínas estables en los siguientes tiempos de incubación 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos utilizando SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie blue. Las proteínas de referencia Horseradish peroxidase (HRP), conocida por su digestión rápida, y ovalbumina (OVA), conocida por su digestión lenta, fueron evaluadas en paralelo.

Las proteínas de referencia HRP y OVA fueron digeridas de manera rápida y lenta respectivamente, confirmando la validez de este estudio. La proteína Cry1Ab fue degradada muy rápidamente en SGF humano, dentro de los 30 segundos de incubación, en presencia de pepsina y a pH 1.2.

La estabilidad de la proteína Cry1Ab fue analizada en fluidos intestinales simulados (SIF) con pancreatina a pH 7.5 y tiempos de incubación entre 0.5 y 60 minutos, siguiendo un protocolo adaptado de SGF (Rouquié, 2007a). Una solución conteniendo Cry1Ab fue incubada con SIF, una solución de pancreatina porcina a pH 7.5, aproximadamente a 37°C. Las muestras fueron analizadas en busca de fragmentos de proteínas estables o la proteína Cry1Ab intacta a tiempos de incubación 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos usando SDS-PAGE seguido de un Western Blot. Para la detección de la proteína Cry1Ab se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra Cry2Ae.

Durante todos los tiempos de incubación, no se llegó a divisar la banda correspondiente a la proteína Cry1Ab. De todas maneras, se observaron bandas de menor peso molecular indicando una degradación rápida e incompleta de Cry1Ab en SIF.

Este resultado indica que la proteína Cry1Ab es degradada parcialmente generando varios fragmentos pequeños y estables en SIF, en presencia de pancreatina y a pH 7.5. Dado que las proteínas de consumo pasan por un proceso continuo que incluye digestión gástrica e intestinal, la degradación incompleta de Cry1Ab en SIF no se considera un factor que pueda causar una preocupación para la salud.

Los parámetros de digestibilidad de la proteína Cry2Ae fueron evaluados en ensayos con SGF conteniendo pepsina y a pH 1.2 en tiempos de incubación de 0.5 a 60 minutos (Rouquié, 2008a). Las proteínas de referencia y Cry2Ae fueron incubadas con SGF humana y una solución de pepsina con pH 1.2 aproximadamente a 37°C. Las muestras fueron analizadas en busca de las proteínas de referencia y fragmentos estables de proteínas en los siguientes tiempos de incubación 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos utilizando SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie blue. Controles apropiados fueron utilizados, incluyendo la proteína Cry2Ae incubada con pH 1.2 sin pepsina, SGF sin Cry2Ae , y un loading control del 10% (dilución 1/10 de la proteína Cry2Ae para verificar la sensibilidad del procedimiento de tinción). Las proteínas de referencia Horseradish peroxidase (HRP), conocida por su digestión rápida, y ovalbumina (OVA), conocida por su digestión lenta, fueron evaluadas en paralelo.

Las proteínas de referencia HRP y OVA fueron digeridas de manera rápida y lenta respectivamente, confirmando la validez de este estudio. La proteína Cry2Ae fue degradada muy rápidamente en SGF humano, i.e. más del 90% de la proteína fue degradada durante los dos primeros minutos de incubación, en presencia de pepsina y a pH 1.2

La estabilidad de la proteína Cry2Ae fue analizada en SIF con pancreatina a pH 7.5 y tiempos de incubación entre 0.5 y 60 minutos (Rouquié, 2008b). Una solución conteniendo Cry2Ae fue incubada con SIF, una solución de pancreatina porcina a pH 7.5, aproximadamente a 37°C. Las muestras fueron analizadas en busca de fragmentos estables de proteínas o la proteína Cry2Ae intacta a tiempos de incubación 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos usando SDS-PAGE seguido de un western blot. Para la detección de la proteína Cry2Ae se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra Cry2Ae. Los controles apropiados

incluyeron Cry2Ae en un buffer sin pancreatina, SIF sin la proteína Cry2Ae, y las condiciones de loading del 10% (para verificar la sensibilidad del procedimiento de detección).

Durante todos los tiempos de incubación, se diviso la banda correspondiente a la proteína Cry2Ae, pero a una intensidad menor que el control sin pancreatina.

Estos resultados indican que la proteína Cry2Ae es degradada parcialmente, i.e. menos del 90% de la proteína desaparece en 60 minutos de incubación en SIF, en presencia de pancreatina y a pH 7.5.

Una batería de pruebas diseñadas para evaluar la proteína PAT en cuanto a características asociadas con alergenicidad y toxicidad no reportó problema alguno (Hérouet, 2004; Hérouet *et al*., 2005). La proteína PAT no comparte una secuencia homóloga con alergenos conocidos ni toxinas y además no es estable en ambientes digestivos. Para completar la evaluación de toxicidad, se expuso a ratones a la proteína PAT vía intravenosa a una dosis de 10mg/Kg. peso corporal. Existe una considerable experiencia en la literatura científica donde se ha usado inyecciones vía intravenosa para evaluar la presencia de toxinas de alimentos o de bacterias. Además, cuando se compara con la ruta de exposición oral, solo se requiere una cantidad muy pequeña para demostrar una respuesta letal o no. Esta aproximación provee una exposición directa a la proteína PAT, que estará intacta dado que por esta vía se evita la degradación en el tracto digestivo. Por lo anterior, esta prueba es considerada la evaluación del peor caso comparada con otras rutas de exposición. Dado que la exposición por la ruta intravenosa de 10 mg/Kg. peso corporal no afectó el peso de los ratones ni manifestó algún signo de toxicidad, puede concluirse que existe una razonable certeza de la inexistencia de riesgo resultado de la inclusión de la proteína PAT en alimento humano o animal.

Resultados en los laboratorios de Bayer usando métodos recomendados por el “International Life Science Institute” (ILSI) han confirmado la rápida degradación de la proteína PAT (dentro de los 30 segundos) en fluidos gástricos simulados (pH 2). También, resultados obtenidos con un método similar y usando un Western blot, bajo condiciones de GLP, mostró una degradación rápida de la proteína PAT (solo segundos) en fluidos intestinales simulados (pH 7.5), en presencia de pancreatina.

Estos estudios de digestión *in vitro* demuestran que la proteína PAT codificada por el gen *bar* posee una estabilidad estructural y funcional muy estrecha bajo condiciones intestinales y

gástricas simuladas. Estos resultados confirman la inocuidad de la proteína PAT para consumo humano o animal debido a que la rápida degradación de la proteína PAT minimiza grandemente la probabilidad de que esta proteína pueda sobrevivir en el tracto digestivo y sea por ello potencialmente absorbida facilitando una reacción tóxica o alergénica.

Además, estudios de puenteo ("bridging"), demostraron la equivalencia estructural y funcional de la proteína PAT (codificada por el gen *bar*) tal como se expresa en el algodón LL25® y la proteína PAT (codificada por el gen *bar*) tal como es producida en *E. coli*, además búsquedas de homología (secuencia y epitopo) indicaron una homología significativa con otras acetiltransferasas.

Más aún, un análisis del contenido de proteína PAT en los productos procesados derivados del algodón LL25® muestra que la cantidad de proteína PAT en productos de semilla decrece durante el procesamiento (Oberdörfer, 2003; ver tabla inferior de este punto). Esto indica que la proteína PAT es degradada durante el proceso de extracción de aceite (altas temperaturas y disolvente). No se detecta proteína PAT en aceite crudo o refinado derivado de algodón LL25®.

Tabla 9. Cantidades de proteína PAT en subproductos procesados del algodón Evento LLCotton25® por ELISA y expresado como porcentaje de Proteína Cruda

Subproducto	PAT (µg/g muestra)	Proteína cruda en la Matriz (% w/w)	Proteína PAT como % (w/w) Proteína cruda
Semillas de algodón sin borra	114 ± 10[c]	243 ± 1	0,047
Cáscaras de semillas de algodón	11,0 ± 2,1	59,8 ± 0,1	0,018
Harina de semilla de algodón	0,03 ± 0,01	452 ± 35	7×10^{-6}
Harina de semilla tostada de algodón	0,02 ± 0,00	450 ± 16	5×10^{-6}

En el evento GlyTol®

En lo que respecta a la proteína EPSPS, ésta se encuentra de manera natural y se expresa ampliamente en cultivos fuente de alimentos (como la soya, el tomate y el maíz). No se han asociado efectos adversos relacionados a la salud en esta proteína. Dado que la proteína 2mEPSPS se deriva del maíz y solo tiene una sustitución de dos aminoácidos, se espera que el perfil de seguridad de la proteína modificada permanezca sin cambios respecto a proteína natural.

Análisis comparativo de la proteína 2mEPSPS producida en *E. coli* y su contraparte extraída del algodón GlyTol® muestra equivalencia estructural y funcional entre ambas. Por consiguiente, la información de seguridad obtenida para la proteína producida en *E. coli* puede ser usada como apoyo para sustentar la seguridad de la proteína 2mEPSPS en el algodón GlyTol®. Adicionalmente, la proteína 2mEPSPS es altamente homóloga y comparte peso molecular y funciones similares con otras proteínas siquimato sintasas, las cuales no han presentado características tóxicas o alergénicas a través de muchos años de consumo. Su identidad con la enzima natural EPSPS es mayor al 99.5%.

Las proteínas EPSPS juegan un papel muy conocido y específico en las plantas. Las propiedades bioquímicas de la enzima 2mEPSPS han sido bien caracterizadas en comparación con la proteína natural EPSPS. Excepto por la insensibilidad al glifosato, el cambio en los dos aminoácidos resulta en propiedades bioquímicas comparables. Los efectos metabólicos de la actividad de la 2mEPSPS en las plantas son comparables a los de las proteínas endógenas EPSPS, excepto por la insensibilidad al glifosato.

La secuencia de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS no muestra similitud a otros alérgenos conocidos, lo cual lo demuestran búsquedas de homología cuando se usa toda la secuencia y el epitopo. Como es esperado, la proteína 2mEPSPS posee una similitud estructural alta solamente con la proteína no-alergénica natural EPSPS del maíz y otras enzimas EPSPS no-alergénicas. Comparte el mismo sitio potencial de glicosilación-N con la enzima EPSPS natural del maíz y ambas proteínas son localizadas en el mismo compartamento celular (plástido). Por lo tanto, es muy poco probable que glicosilación post-traduccional ocurra en la proteína 2mEPSPS, lo cual conduciría a características alergénicas diferentes de la enzima natural.

Otro aspecto importante de la proteína 2mEPSPS es que se degrada rápidamente y completamente en simulaciones de fluidos gástricos e intestinales humanos. Esto minimiza la probabilidad de que ésta proteína pudiera sobrevivir y ser absorbida en el tracto digestivo humano. En adición, no hubo mortalidad, signos clínicos, o efectos relacionados al tratamiento en ratones OF1 después de una administración oral aguda, vía tubo o jeringa, de la proteína 2mEPSPS a una concentración de 2, 000 mg de proteína por Kg. de peso corporal (Hérouet-Guicheney *et al*., 2009). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

I.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

En el evento TwinLink™

Las secuencias nucleótidos de los promotores y terminadores del evento T304-40 se muestran en Moens y De Pestel, 2008. Asimismo, las secuencias reguladoras presentes en el evento GHB119 se muestran en Verhaeghe y Habex, 2008. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

La expresión del gen *cry1Ab* en el evento T-304-40 está regulada por el promotor *Ps7s7* del virus del mosaico del trébol, la secuencia líder *5'e1* y el terminador 3'me1 de *Flaveria hidentis*. La expresión del gen *bar*, utilizado como marcador de selección, está controlada por el promotor *P35S3* y el terminador *3'nos*.
Por su parte en el evento GHB119 la expresión del gen *cry2Ae* está dirigida por el promotor *P35S2*, la secuencia líder del gen *5'cab22L* de la petunia, el péptido de tránsito *TPssuAt* de Arabidopsis y el terminador *3'35S*. La expresión del gen *bar*, utilizado como marcador de selección, está controlada por el promotor *Pcsvmv XYZ* y el terminador *3'nos*.

Ninguna de las secuencias reguladoras pertenece a la especie receptora. Los datos obtenidos a partir de los estudios de Southern blot realizados con el evento de transformación T304-40 demuestran que se integró una copia casi completa del ADN-T dentro del genoma de la planta, flanqueada por una copia incompleta invertida del casete del gen *cry1Ab* y un terminador *3'me1* adicional. Para el evento GHB119, experimentos de hibridación por Southern Blot demostraron que solamente una copia del ADN-T fue integrada en el genoma

de Gossypium hirsutum y que el ADN transferido a la planta mantiene la misma configuración original diseñada en el vector de transformación (Se detalla también en la sección I.h).

En el evento GlyTol®

Las secuencias reguladoras de la expresión del gen *2mepsps* se describen en Habex y Lecleir, 2006 y Habex, 2007. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Ninguna de las secuencias reguladoras pertenece a la especie receptora y el análisis Southern Blot y de PCR demuestran que sólo se integró una copia del casete de expresión (Se detalla también en la sección I.h).

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

De los organismos donadores:

El algodón GLT es producto del cruzamiento convencional de los eventos individuales TwinLink™ y GlyTol®. El evento combinado TwinLink™ a su vez fue producido por medio del cruzamiento convencional de los eventos T304-40 y GHB619. Por consiguiente, el algodón GLT porta los genes *cry1Ab*, *cry2Ae* y *bar* contenidos en el evento TwinLink™ y el gen *2mepsps* del evento GlyTol®.

Enseguida se describe la historia de uso seguro de los organismos donadores de los genes principales.

Para los genes *cry1Ab* y *Cry2Ae*

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se encuentra mundialmente distribuida y que habita de manera natural en el suelo, granos, superficie de las hojas y agua. No solo se encuentra en varios ambientes naturales, sino también en muchos animales, incluyendo animales silvestres (por ejemplo ratón de campo, venados, roedores y mamíferos insectívoros) y probablemente en el hombre, así como también en los alimentos (por ejemplo pasta, pan y alimentos procesados que contienen harina) (OECD, 2007). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Ha sido utilizada comercialmente durante casi 40 años para el control de insectos con las ventajas de no afectar al ambiente y tener una elevada especificidad. Las cepas de *Bt* son generalmente clasificadas como bacterias no patogénicas en muchas clasificaciones nacionales de microorganismos. Ha sido raramente clasificado como un patógeno oportunista.

Para el gen *bar*

Streptomyces hygroscopicus, es una bacteria saprofítica, segura y común del suelo sin ninguna evidencia de efectos patogénicos, tóxicos o alergénicos para humanos y animales.

Los donadores de las secuencias promotora y terminadora el Virus del Mosaico de la Coliflor (CAMV) *y Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente, son causante de enfermedades en las plantas; sin embargo, los genes que les confieren la virulencia han sido eliminados, por lo que el manejo de estos organismos no constituye algún riesgo.

Para el gen *2mepsps*

El organismo donador, el maíz (*Zea mays*), es una planta cultivada, inocua, que se usa ampliamente como fuente de alimentación. Posee un efecto patogénico, tóxico o alergénico muy reducido para los seres humanos y los animales.

Del organismo receptor:

El algodón se cultiva ampliamente y tiene una historia de uso seguro. El algodón no es considerado dañino ni patogénico para humanos, sin embargo la planta produce gosipol y ácidos grasos ciclopropenoides (CPFA, cyclopropenoid fatty acids), los cuales son tóxicos naturales.

El gosipol es una sustancia terpenoide encontrada naturalmente en muchas especies de *Gossypium* incluyendo al algodón y se encuentra localizada en glándulas a lo largo de toda la planta, incluyendo la semilla (Abou-Donia, 1989). Los aldehídos de terpenoides en las glándulas de pigmento son una fuente importante de resistencia a herbívoros e insectos. Los niveles de gosipol encontrados en alimentos humanos y animales fabricados a partir de semilla de algodón deben ser minimizados ya que pueden causar problemas toxicológicos como disminución del apetito, pérdida de peso corporal y disnea (Berardi y Goldblatt, 1980). El gosipol se encuentra en estado libre en la semilla entera y se une a la lisina u otro componente durante su procesamiento en alimento. Se considera que el gosipol unido de esta manera no está disponible para los animales. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Los ácidos grasos ciclopropenoides (0.1 - 1.3% del aceite de semilla de algodón), estercúlico (C-19) y ácido malválico (C-18), son ácidos grasos únicos comunes en algodón. Los niveles de ácidos grasos ciclopropenoides deben ser también minimizados debido a sus efectos

indeseables, los cuales dan como resultado alimentos inseguros (Cherry y Leffler, 1984; Phelps *et al*., 1965). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Los efectos adversos potenciales del ácido fítico sobre la salud de humanos y animales incluyen propiedades anti-calcificantes raquitogénicas, disminución en la ganancia de peso y menor alimentación, disminución en la absorción de minerales y deficiencias de minerales (Maga, 1982; Bruce y Callow, 1934). El ácido fítico también tiene un efecto negativo sobre la bio-disponibilidad de proteínas y la actividad enzimática al interferir con los grupos polares laterales de proteínas, causando por lo tanto la formación de proteínas nutricionales complejas o cambios en la conformación molecular de enzimas (Fretzdorff, 1992).

Estos ácidos son desactivados o removidos en gran medida del aceite por hidrogenación o durante la desodorización a 230-235°C.

I.r Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotipo que confiere estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de estos genes

El gen *bar* se utilizó como marcador de selección para la generación de los eventos T304-40 y GHB119, componentes centrales del algodón **TwinLink™**. Este gen permite la selección de las plantas por la tolerancia que les confiere a la aplicación del herbicida Glufosinato de Amonio. El gen *bar* codifica a la enzima PAT, la cual cataliza la conversión de L-fosfinotricina, el ingrediente activo en el Glufosinato de Amonio, a su forma inactiva, confiriendo así resistencia al herbicida.

El glufosinato de amonio se define como un herbicida de contacto no selectivo. Después de la aplicación, el ingrediente activo fosfinotricin actúa a través de la hoja. No ha sido detectada acción en las raíces de las plantas después de la emergencia y no causa daño a plántulas antes de la emergencia. Rápidamente después de ser absorbido, el herbicida interviene en el metabolismo del amonio de las plantas tratadas. El transporte sistémico de las hojas tratadas a otras partes de la planta no esta limitado (Wild and Manderscheid, 1984; Manderscheid and Wild, 1986; Wild *et al*., 1987; Bremmer *et al*., 1997; Wendler *et al*., 1990). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

El amoniaco es un importante eslabón entre los procesos catabólico y anabólico en el metabolismo de la planta y es liberado y reasimilado en grandes cantidades en diferentes procesos. Sin importar el origen, sin embargo, es esencial que el amonio sea convertido rápidamente a una forma no tóxica para el organismo (Wild and Manderscheid, 1984). Esta reacción de desintoxicación es guiada por la enzima glutamino sintetasa (GS). Bajo condiciones normales, el amonio producido durante varios procesos metabólicos en la célula de la planta es principalmente enlazado con ácido glutámico para formar glutamina. Este proceso es catalizado por la enzima glutamino sintetasa (GS), una enzima clave del metabolismo del nitrógeno en plantas que puede desintoxicar el amonio en una forma suficiente (Wedler *et al*., 1976; Miflin *et al*., 1977; Keys *et al*., 1978; Wild and Manderscheid, 1984; Gebhardt *et al*., 1986; Wild *et al*., 1987; De Block *et al*., 1987). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

El glufosinato de amonio inhibe la actividad de la enzima GS, de la cual al menos dos isoenzimas que difieren en su compartamentalización celular, pueden ocurrir en tejido verde de la hoja de plantas superiores (Miflin *et al*., 1977; Wild and Manderscheid, 1984; Ridley and McNally, 1985). El herbicida activo, el compuesto PPT es un análogo del glutamato (Wendler *et al*., 1990) y es un inhibidor específico de la enzima glutamino sintetasa (Wild and Manderscheid, 1984). Parece que ejerce su efecto como un inhibidor competitivo de la glutamino sintetasa. Como resultado el metabolismo del amoniaco en la planta se ve afectado inmediatamente después de la aplicación del producto herbicida (Wild and Manderscheid, 1984; Manderscheid and Wild, 1986; Lindsey *et al*., 1989) y el amonio acumulado en el tejido vegetal (Wild *et al*., 1987). Simultáneamente, la fotosíntesis es también severamente inhibida (Sauer *et al*., 1987; Wendler *et al*., 1990). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

En tanto que para la generación del evento **GlyTol®** el gen *2mepsps* se utilizó como marcador de selección. Este gen permite la selección de las plantas por la tolerancia que les confiere a la aplicación del herbicida glifosato. Este gen codifica a la proteína 2mEPSPS, la cual es insensible a la acción del glifosato, de manera que las plantas que portan el gene son tolerantes a dicho herbicida.

El modo de acción del glifosato [N-(fosfonometilo) glicina], un aminoácido análogo sencillo, consiste en la inhibición selectiva de la EPSPS sintasa que es la sexta y penúltima enzima de la ruta del siquimato (Steinrücken and Amrhein, 1980). La reacción catalizada por la EPSPS es la transferencia reversible del fosfoenolpiruvato (PEP, por sus siglas en Inglés) al siquimato-3-fosfato (S3P, por sus siglas en Inglés), conduciendo a la formación del 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSP, por sus siglas en Inglés). La unión del sustrato a la enzima es secuencial, con el S3P uniéndose primero, seguido por PEP (Boocock and Coggins, 1983). La reacción catalizada por la EPSPS procede por medio del rompimiento del puente C-O del PEP (Walsh *et al*., 1996). En plantas cultivadas convencionalmente, la EPSPS es inhibida selectivamente por el glifosato, produciendo su muerte debido a la interrupción de la síntesis de aminoácidos aromáticos y metabolitos secundarios (Steinrücken and Amrhein, 1980).

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

Los estudios de *Southern Blot* demuestran que el ADN proveniente de los eventos T304-40 y GHB119 se mantiene intacto en el algodón TwinLink™ una vez que fueron cruzados por métodos tradicionales. Los eventos progenitores muestran su estabilidad molecular por varias generaciones (al menos seis), en varias regiones de cultivo y bajo diferentes condiciones ambientales.

Por lo anterior, no se espera que haya variaciones en el evento apilado GLT.

I.t Referencia bibliográfica sobre los datos presentados

Algodón TwinLink™

Mertens and Moens, 2008 para el evento T304-40 *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Verhaeghe and Criel, 2008 para el evento GHB119 *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Evento GlyTol®

Habex, 2006. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Evento GLT

Currier, 2009. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA O ZONAS DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM

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

La superficie solicitada y la cantidad de semilla a sembrar se describen a continuación:

Superficie de liberación (Ha):	**50**
Cantidad de semilla a liberar (Kg):	**850**

En el **Anexo I** se presentan más detalles.

II.b Ubicación, en coordenadas UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

El polígono de liberación al ambiente tiene los extremos:

Polígono de Mexicali					
Vértice	**Latitud**	**Longitud**	**X**	**Y**	**Zona**
0	32.62990	-115.87122	605886.85	3610821.28	11
1	32.71716	-114.71826	713851.82	3622234.24	11
2	32.48215	-114.77762	708832.09	3596056.11	11
3	32.36717	-114.40979	743714.88	3584085.26	11
4	32.01085	-114.77202	710443.24	3543807.87	11
5	32.09637	-114.85278	702624.79	3553135.63	11
6	32.17419	-114.94482	693772.96	3561594.65	11
7	32.12307	-114.99126	689499.35	3555843.99	11
8	32.01560	-114.97581	691180.73	3543955.65	11
9	31.98344	-114.99630	689311.25	3540353.91	11
10	31.97869	-115.23094	667147.56	3539440.50	11
11	31.83905	-115.19191	671094.11	3524020.25	11
12	31.75517	-115.09136	680773.68	3514883.65	11
13	31.53415	-115.09156	681183.09	3490380.14	11
14	31.53945	-115.53696	638885.12	3490316.70	11
15	32.00161	-115.83153	610369.69	3541210.60	11

Polígono del Norte de Sonora					
Vértice	**Latitud**	**Longitud**	**X**	**Y**	**Zona**
0	31.93635	-112.98675	312194.62	3535103.423	12
1	31.32914	-110.77219	521673.0932	3466102.236	12
2	31.33749	-110.45499	551846.1775	3467133.517	12
3	29.79219	-110.17949	579302.0328	3296040.812	12
4	29.80361	-111.32509	468584.1837	3297068.36	12
5	29.31787	-112.04344	398678.576	3243655.501	12
6	29.32713	-112.28348	375379.3153	3244913.423	12
7	30.80355	-113.11414	297736.8288	3409742.149	12
8	30.94991	-113.09001	300349.7502	3425923.947	12
9	31.21171	-112.8986	319134.3674	3454618.317	12
10	31.3036	-113.56168	256187.0665	3466082.271	12
11	31.45396	-113.59459	253447.2023	3482828.101	12
12	31.43103	-112.98362	311471.4229	3479074.713	12
13	31.6679	-113.16438	294807.2369	3505661.149	12
14	31.76001	-112.98498	312004.4177	3515549.625	12

Polígono del Sur de Sonora					
Vértice	**Latitud**	**Longitud**	**X**	**Y**	**Zona**
0	29.68694	-111.41096	460239.87	3284167.20	12
1	27.96560	-108.95230	701423.13	3095080.05	12
2	27.10799	-109.16547	681857.35	2999723.14	12
3	26.47256	-108.90545	708800.13	2929720.37	12
4	26.34164	-109.12292	687327.55	2914881.09	12
5	26.57712	-109.28211	671089.17	2940746.53	12
6	26.66167	-109.42193	657046.29	2949933.59	12
7	26.70040	-109.67181	632131.15	2953940.69	12
8	26.87311	-109.86249	612989.09	2972888.15	12
9	27.07189	-109.93112	605985.24	2994847.71	12
10	27.13111	-110.16072	583174.28	3001234.82	12
11	27.18148	-110.16393	582818.99	3006812.11	12
12	27.22139	-110.36998	562385.41	3011113.50	12
13	27.54539	-110.54990	544439.57	3046925.26	12

Polígono del Sur de Sonora					
Vértice	**Latitud**	**Longitud**	**X**	**Y**	**Zona**
14	27.89948	-110.53958	545311.87	3086152.52	12
15	28.01554	-111.18460	481852.25	3098937.54	12
16	28.37383	-111.45025	455883.75	3138696.93	12
17	28.66436	-111.82667	419222.14	3171080.03	12
18	28.84445	-111.85216	416874.06	3191050.43	12
19	28.89353	-112.03942	398654.01	3196633.94	12
20	29.21836	-112.16882	386392.94	3232744.11	12

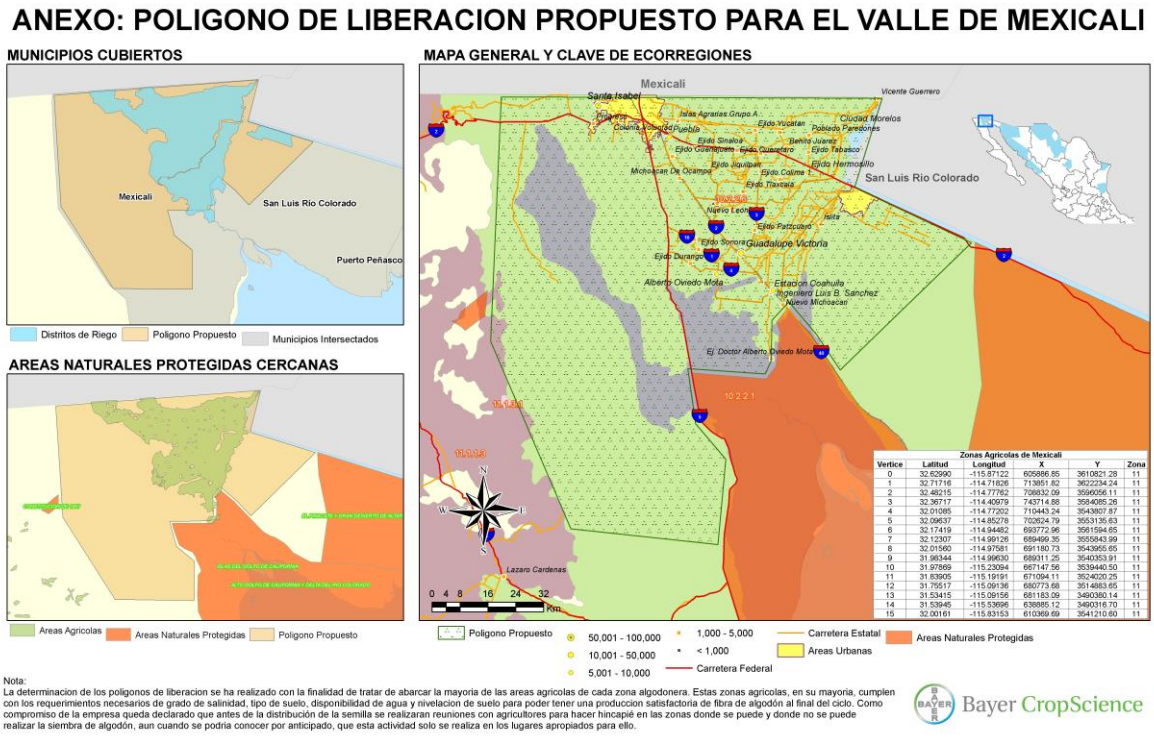
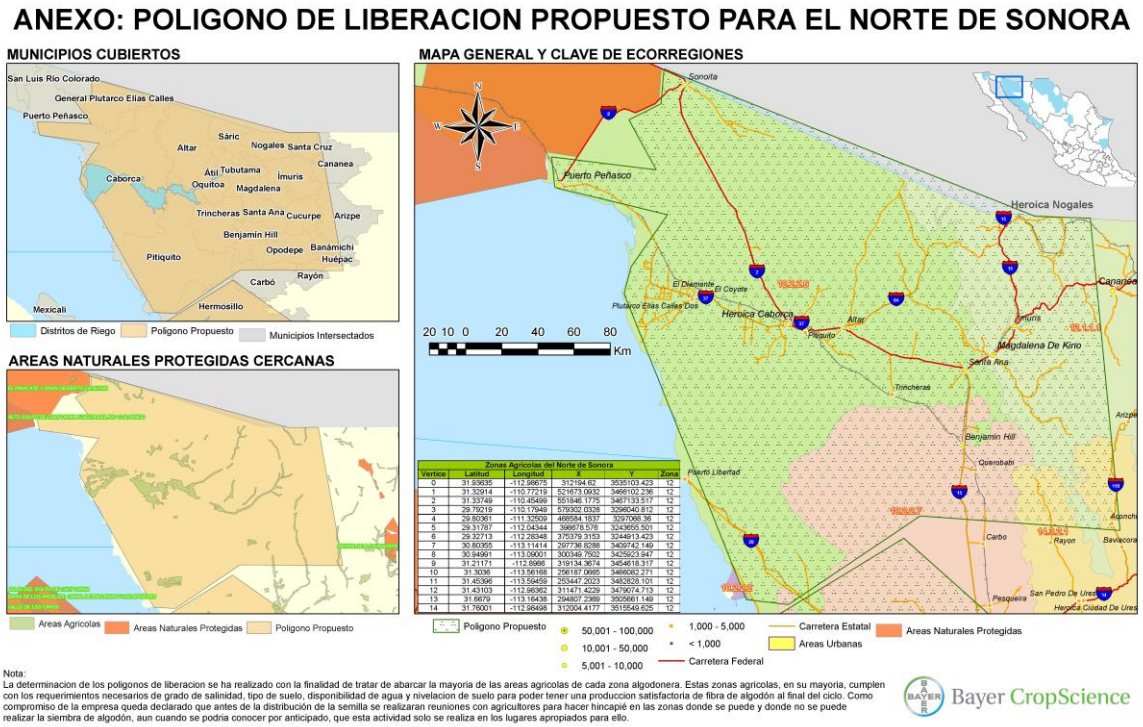


Figura 16. Polígonos seccionados donde se liberará el algodón GLT en la región agrícola del Valle de Mexicali-San Luis Río Colorado y Sonora



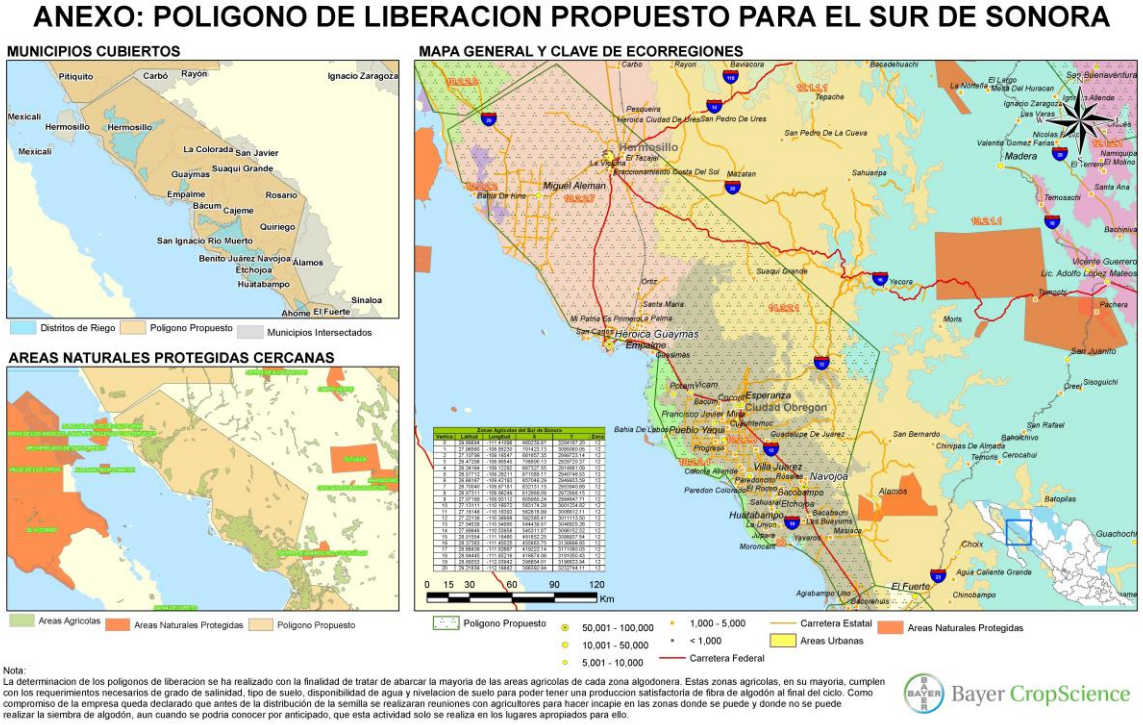


Figura 16. Polígonos seccionados donde se liberará el algodón GLT en la región agrícola del Valle de Mexicali-San Luis Río Colorado y Sonora

II.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 el algodón en el área de liberación y en zonas vecinas. El único cultivo con el cual podría cruzarse son otros cultivos comerciales de algodón, 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 algodoneras del estado de Baja California y Sonora en los municipios de: Mexicali (**Baja California**) San Luis Rio Colorado, Caborca, Pitiquito, Opodepe, Benjamin Hil, Trincheras, Santa Ana, Trincheras, Rayón, Aconchi, Huepac, Banamichi, Arizpe, Imuris, Magdalena, Tubutama, Atil, Oquitoa, Altar, Santa Cruz, Nogales, Saric, Cananea, Puerto Peñasco, Plutarco Elias Calles,. Mazatán, San Miguel de Horcasitas, Hermosillo, Huatabampo, Navojoa, Alamos, Etchojoa, Benito Juárez, Cajeme, Quiriego, Bacum, San Ignacio Rio Muerto, Guaymas, Rosario, Empalme, Onávas, San Javier, La Colorada, Ures, Carbó, (**Sonora**)

La liberación del algodón GlyTol® x TwinLink™ se hará exclusivamente dentro de los polígonos especificado en la solicitud, los cuáles se encuentran a una distancia considerable del Área Natural Protegida de El Pinacate y Gran Desierto de Altar, Alto Golfo de California y Delta del Rio Colorado, Sierra de Ajos/Bavispe, Campo Verde, Tutuaca, Papigochic, Cascada de Bassaseachic, Sierra de Alamos-Rio Cuchujaqui. Constitución de 1857, El Pinacate y Gran Desierto de Altar, Islas del Golfo de California, Alto Golfo de California y Delta del Rio Colorado; no obstante y con fundamento en lo establecido en el Artículo 89 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y los artículos 48 y 49 de la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, Bayer de México, S.A. de C.V. se compromete a establecer los controles y cumplir con las medidas de bioseguridad necesarios para que la liberación de algodón genéticamente modificado no se realice en las zonas núcleo del Área Natural Protegida de El Pinacate y Gran Desierto de Altar, Alto Golfo de California y Delta del Rio Colorado, Sierra de

Ajos/Bavispe, Sierra de Ajos/Bavispe, Campo Verde, Tutuaca, Papigochic, Cascada de Bassaseachic, Sierra de Alamos-Rio Cuchujaqui. Constitución de 1857, El Pinacate y Gran Desierto de Altar, Islas del Golfo de California, Alto Golfo de California y Delta del Rio Colorado.

Sitios Ramsar

Dentro del polígono de liberación del Valle de Mexicali existe una zona de traslape con los sitios Ramsar denominados: ***Sistema de Humedales Remanentes del Río Colorado y humedales del Delta del Río Colorado***; Dentro del polígono de liberación del Norte del Estado de Sonora existe una zona de traslape con los sitios Ramsar denominados: **Bahía de San Jorge, Sierra de Ajos y Bavispe**; para el caso del Sur del Estado de Sonora en los terrenos de los municipios de ***Empalme, Guaymas, San Ignacio Río Muerto y Huatabampo*** se localiza parte de los sitios Ramsar denominados ***Complejo Lagunar Bahía Guásimas-Estero Lobos, Humedales de Yavaros- Moroncarit*** y ***Sistema Lagunar Agiabampo-Bacorehuis-Rio Fuerte Antiguo.***

La superficie aproximada considerada “sitios RAMSAR” en estos sitios sobrepasa las 15,000 hectáreas de uso agrícola en total, por lo que los productores de algodón de estas regiones han manifestado a esta empresa su preocupación de que estas zonas agrícolas sean consideradas como Áreas Naturales Protegidas y que en un momento dado exista la prohibición de liberar semilla de algodón genéticamente modificada; ya que esto les generaría un impacto económico considerable.

Es pertinente acotar que durante los últimos años los productores han sembrado semilla de algodón GM, y que a este momento esta empresa no cuenta con semilla convencional adaptada a estas regiones que pueda ser provista a los agricultores en lugar de la semilla GM.

Si bien México se ha adherido a la Convención sobre Humedales de Importancia Internacional (Convención RAMSAR) y que los países que se adhieren a dicha convención asumen, entre otros compromisos los siguientes:

- “Incorporar consideraciones relativas a la conservación de humedales en su planificación nacional de uso del suelo
- Se comprometen a formular y llevar a cabo su planificación de manera que promueva, en la medida de lo posible, el uso racional de los humedales en su territorio

- Promover el manejo/gestión y la vigilancia de los humedales"

Dicha Convención no establece la prohibición de llevar a cabo actividades agrícolas con Organismos Genéticamente Modificados en los humedales. El Artículo 6º de dicha Convención instituye que se llevarán a cabo revisiones mediante reuniones denominas "Conferencia de las Partes", las cuales tendrán lugar cada tres años; en tales se actualizarán los temas y se adoptarán resoluciones internacionales en materia de humedales. Derivado de la 10ª. Conferencia de las partes celebrada en 2008 (la más reciente), no se observa que exista una recomendación expresa que prohíba la liberación de Organismos Genéticamente Modificados en sitios RAMSAR.

Es pertinente señalar que de acuerdo con lo establecido en los artículos 89 y 119 Fracc. XIII de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, estará prohibido liberar OGM's a menos de 1 kilómetro de cualquier "Áreas Naturales Protegidas" que así sean declaradas de conformidad con la legislación aplicable, y los Sitios Ramsar no han sido declarados por el titular del Ejecutivo Federal como Áreas Naturales Protegidas, ni han sido publicadas en el diario Oficial de la Federación como tales.

Considerando lo señalado previamente, sometemos a su amable consideración que la actividad agrícola de la región noroeste del país se vería seriamente afectada si a juicio de las autoridades se considera que los sitios Ramsar deben estar libres de actividades relacionadas con OGM's.

3. Plano de ubicación señalando las principales vías de comunicación.

En la Carpeta de anexos y Referencias contenida en los dispositivos electrónicos que acompañan esta solicitud, se presenta el plano de ubicación señalando la ruta de movilización, además los mapas de la SCT de las carreteras y caminos de los estados de Chihuahua, Baja California y Sonora, en dónde se puede observar con mayor detalle la ruta descrita, y en su caso, las posibles rutas alternas, en caso de que se presente algún imprevisto.

III. IDENTIFICACIÓN DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DEL OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

III.a Estabilidad de la modificación genética del OGM

La estabilidad del inserto en los eventos GlyTol® y TwinLink™ fue demostrada por medio de segregación Mendeliana (como se discute en la sección I.j), así como también por medio de análisis Southern blot. La estabilidad del inserto fue demostrada en múltiples generaciones en los eventos progenitores del algodón TwinLink™ y del algodón GlyTol®, tal como se mencionó en el inciso I.s.

Por lo tanto, no se espera cambios en la estabilidad de dichos transgenes en el evento combinado GLT puesto que fue generado por medio del cruzamiento convencional de los eventos TwinLink™ y GlyTol®.

III.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

En la sección i se muestran los contenidos de las proteínas en varios tejidos de las plantas de algodón que portan los eventos TwinLink™ y GlyTol®, respectivamente. En el siguiente cuadro se muestra la información para el algodón TwinLink™ y sus progenitores.

Tabla 10. Contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™. El contenido de las proteínas es expresado en µg/g peso fresco

Proteína	Tejido	T304-40	GHB119	TwinLink™
Cry1Ab	Hojas	1.76 ± 0.69	N/A	2.40 ± 1.51
	Cuadros	2.63 ± 0.69	N/A	1.23 ± 0.41
	Grano	0.39 ± 0.32	N/A	0.43 ± 0.23
Cry2Ae	Hojas	N/A	4.98 ± 0.59	41.3 ± 22.0
	Cuadros	N/A	14.9 ±7.60	4.89 ± 1.46
	Grano	N/A	0.12 ± 0.17	0.23 ± 0.21
PAT	Hojas	189 ± 29	13.6 ± 2.1	443 ± 222
	Cuadros	108 ± 39	93.4 ± 48.3	95 ± 23
	Grano	0.67 ± 0.5	0.65 ± 0.54	1.7 ± 0.8

Similarmente, el contenido de la proteína 2mEPSPS en varios tejidos del algodón GlyTol® se muestra a continuación:

Tabla 11. Niveles de la proteína 2mEPSPS en tejidos de la planta del algodón GlyTol®

Matriz	Contenidos de la proteína 2mEPSPS (µg/g peso fresco) ± SD [% PTE]			
	Etapa de crecimiento 1	Etapa de crecimiento 2	Etapa de crecimiento 3	Etapa de crecimiento 4
Hoja	11.16 ± 3.73 [0.121]	7.94 ± 2.87 [0.090]	6.52 ± 7.20 [0.385]	0.45 ± 0.22 [0.028]
Tallo	ND	1.94 ± 0.61 [0.062]	ND	1.58 ± 0.96 [0.039]
Raíz	ND	0.99 ± 1.00 [0.074]	ND	4.04 ± 1.71 [0.176]
Cuadros	NA	NA	NA	5.35 ± 0.25 [0.175]
Ápice	ND	ND	ND	5.47 ± 0.22 [0.338]
Polen	NA	NA	NA	0.16 ± 0.00 [0.001]

*** ND = No Determinado; NA = No Aplicable**

III.c Características del fenotipo del OGM

El algodón GLT no se diferencia de su contraparte convencional, excepto por las características de resistencia a insectos lepidópteros y la tolerancia al efecto de los herbicidas Glufosinato de Amonio y Glifosato conferidas por la introducción de los genes *cry1Ab*, *cry2Ae* y *bar* en el evento TwinLink™ y por el gen *2mepsps* en el evento GlyTol®.

III.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

Con base en los resultados de la diversa gama de estudios que se han realizado sobre el algodón GLT, no hay ninguna característica física y fenotípica nueva relacionada con el algodón GLT que genere efectos adversos sobre la diversidad biológica ni en el medio ambiente.

III.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

En la siguiente tabla se presenta un resumen de las características fenotípicas del algodón TwinLink™ en comparación con variedad receptora:

Tabla 12. Hábito de crecimiento y morfología de la planta en varias regiones de los EE UU. Comportamiento del algodón TwinLink™ y la variedad Coker, con aplicación y sin la aplicación del herbicida glufosinato de amonio (GA)

Hábito de crecimiento y fenotipo						
	Coker	TwinLink™ GA	TwinLink™	Significancia		
				LSD	CV	S.D.
Días a la floración	54.19a	51.81b	51.86b	2.110	1.24	1.953
% de bellotas abiertas	47.86b	59.86a	58.95b	9.726	5.4	9.003
Altura de la planta en cm.	101.69a	96.87b	96.59b	3.560	1.02	3.019
# total de nudos	17.89a	16.97b	16.95b	0.762	1.36	0.706
Proporción altura:nudo	5.65a	5.63a	5.63a	0.207	1.04	0.175
# de bellotas en primera posición	4.40a	4.70a	4.61a	1.096	7.4	1.015
% retención en primera posición	100.00b	167.11a	171.28a	9.572	0.98	4.296
# total de bellotas	9.51a	9.05a	8.89a	1.809	6.1	1.674
Uniformidad de la var	1.43a	1.43a	1.43a	0	0	0
Tipo de bellota	4.29a	4.29a	4.29a	0	0	0
Acame	1.14a	1.14a	1.14a	0	0	0

También se efectuó un análisis fenotípico del algodón GlyTol® en 2004 y 2005. Los datos se muestran a continuación.

Tabla 13. Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2004

Hábito de crecimiento y fenotipo, 2004									
Parámetro agronómico	No asperjado (a)		1 x tasa (b)		3 x tasa (c)		Significancia		
	C312	GHB614	C312	GHB614	C312	GHB614	LSD	CV	SIG
Días a la floración	56.429	56.464	56.286	56.714	55.81	56	1.656	4.77	NS
Días a la primera bellota	107.25	105.31	105.56	105.81	106.63	104.31	4.14	4.25	NS
% de bellotas abiertas	46.938	50.5	52.688	53.063	53.5	51.813	1.078	23.17	NS
Altura de la planta	42.086	39.546	41.581	41.542	42.005	41.362	3.14	12.31	NS
# total de nudos	16.933	16.029	16.419	16.262	16.938	16.5	1.465	14.08	NS
Proporción altura:nudo	2.455	2.494	2.54	2.538	2.548	2.533	0.3716	24.87	NS
# de bellotas en primera posición	5.624	5.576	5.4	5.695	5.981	6.2	1.013	30.48	NS
# total de bellotas	11.143	10.529	10.867	11.043	12.367	12.1	2.289	35.46	NS
Uniformidad de la variedad	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS
Morf. de la hoja	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS
Morfología de la flor	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS
Morf. de la bellota	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS
Morf. de la planta	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS

a, b, y c son regímenes de tratamientos e indican en cuáles tratamientos se encontraron diferencias significativas. b es glifosato a una concentración de 450 g de i.a./acre; c es tres veces la concentración de glifosato descrita para b.

Tabla14. Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2005

Hábito de crecimiento y fenotipo, 2005									
Parámetro agronómico	No asperjado (a)		1 x tasa (b)		3 x tasa (c)		Significancia		
	C312	GHB614	C312	GHB614	C312	GHB614	LSD	CV	SIG
Días a la floración	59.667	60.292	59.5	61.042	58.58	60.333	1.08	3.08	NS
Días a la primera bellota	107	106.94	107.47	107.72	107.5	108.06	7.639	15.34	NS
% de bellotas abiertas	43.19	46.389	41.389	42.778	41.389	40.417	3.4746	21.69	NS
Altura de la planta	28.336	29.125	28.636	28.622	29.099	28.766	1.3995	10.35	NS
# total de nudos	16.681	16.622	16.811	16.626	16.97	16.907	0.4856	7.11	NS
Proporción altura:nudo	1.957	1.967	1.936	1.919	1.953	1.917	0.0924	8.86	NS
# de bellotas en primera posición	4.804	5.015	4.889	4.815	4.789	4.704	0.5397	23.24	NS
# total de bellotas	8.2	8.526	8.626	8.044	8.433	7.867	1.03	25.65	NS
Uniformidad de la variedad	3.806	3.722	3.639	3.833	3.472	3.694	0.3845	24.95	NS
Morf. de la hoja	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS
Morfología de la flor	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS
Morf. de la bellota	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS
Morf. de la planta	1	1	1	1	1	1	N.V.	N.V.	NS

a, b, y c son regímenes de tratamientos e indican en cuáles tratamientos se encontraron diferencias significativas. b es glifosato a una concentración de 450 g de i.a./acre; c es tres veces la concentración de glifosato descrita para b.

De la misma manera, no se espera que el algodón GLT difiera fenotípicamente ni de sus progenitores ni de su contraparte convencional.

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

Con base en los resultados de la amplia gama de estudios realizados al algodón GLT y sus predecesores, no se ha reportado ningún efecto sobre la diversidad biológica y al medio ambiente derivados de la liberación al ambiente del mismo. El cultivo del algodón modificado con las características de resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas tiene una historia larga de uso seguro.

III.g Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad

El algodón GLT expresa las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, PAT y 2MEPSPS. Existen tiras reactivas (Envirologix), las cuales detectan rápidamente a tales proteínas. A nivel molecular se puede hacer una detección por medio de PCR, en la sección de caracterización molecular se proveen las referencias en las que se encuentran los *primers* específicos para efectuar la reacción.

Los Métodos de detección para los eventos GlyTol® (GHB614), T304-40 y Liberty Link® (GHB119) se incluyen en la Carpeta de Anexos y Referencias. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

III.h Existencia de potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas

El entrecruzamiento entre variedades comerciales de *Gossypium hirsutum* es bajo y ocurre exclusivamente a través de insectos. De tal manera que la frecuencia de polinización cruzada entre variedades de algodón depende de las poblaciones de insectos y su actividad migratoria al momento de la polinización. Por lo anterior, la probabilidad de que ocurra entrecruzamiento entre especies comerciales y silvestres de algodonero es muy baja.

III.i Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados

Van Deynze *et al*., 2005. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD

IV.a Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad

IV.a.1 Plan de monitoreo detallado

Se efectuará un monitoreo comprensivo durante la liberación y todo el ciclo de cultivo del algodón GLT. Las actividades incluyen:

- ⇨ Efectuar una localización georreferenciada de los lotes de los agricultores cooperantes que siembren el algodón GLT 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 cabe la posibilidad que la liberación se efectúe 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 del algodón GLT. Además, todo el personal involucrado deberá saber que debido a que el algodón GLT tiene como características la resistencia a insectos lepidópteros y la tolerancia a la aplicación de los herbicidas Glufosinato de Amonio y Glifosato, es posible detectarlo con facilidad con respecto a otro tipo de algodones.

El plan de capacitación incluye:

Grupo a capacitar	Responsable de la capacitación	Fecha de la capacitación
Investigadores responsables	Personal de Asuntos Regulatorios y/o Representantes de Desarrollo Comercial de Bayer CropScience BioScience	3ª y 4ª semana de Noviembre 2014
Personal asistente de los investigadores	Investigadores responsables y/o Personal de Asuntos Regulatorios y/o Representantes de Desarrollo Comercial de Bayer CropScience BioScience	3ª y 4ª semana de Noviembre 2014
Técnicos locales	Personal de Asuntos Regulatorios y Representantes de Desarrollo	3ª y 4ª semana de Noviembre 2014

	Comercial de Bayer CropScience BioScience,	
Agricultores cooperantes	Personal de Asuntos Regulatorios y Representantes de Desarrollo Comercial de Bayer CropScience BioScience,	3ª y 4ª semana de Noviembre 2014

⇨ El programa de monitoreo se realizará en las zonas donde se siembre el algodón biotecnológico durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento GLT y procediendo a su destrucción.

IV.a.2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación

El programa de monitoreo se realizará en las zonas donde se siembre el algodón biotecnológico durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento apilado GLT 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 fueron sembradas las variedades con el evento GLT deberá hacerse monitoreos de voluntarios durante un periodo no menor a los 12 meses después de la destrucción del campo experimental de algodón. 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 esta sembrada con la nueva prueba regulada debe ser monitoreado para buscar voluntarios.

⇨ Los monitoreos empezarán después de la destrucción del campo experimental de algodón, 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.

IV.a.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 del algodonero, en caso de ser necesario y donde llegara a existir controversia respecto al origen del algodón que se esté sembrando en la zona de liberación y zonas vecinas, se utilizarán tiras reactivas para detectar el evento GLT en muestras de hojas.

IV.b Medidas y procedimientos de bioseguridad

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

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 evitar que se siembre algodón GLT 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. El algodón es una planta que no se reproduce vegetativamente cuando crece en el campo, de tal manera que la única forma de que el algodón transgénico sobreviva es mediante la diseminación por semilla.

El manejo en campo del algodón GLT será siempre realizado por personal capacitado y experimentado en el manejo de este tipo de material.

El acceso a los lotes donde se sembrará el algodón GLT estará restringido solo a personal autorizado por la compañía para tal fin y personal del investigador responsable.

IV.b.2. Medidas y procedimientos para disminuir el acceso de organismos vectores de dispersión, o de personas que no se encuentren autorizadas para ingresar al área de liberación a dicha zona o zonas

Las siguientes medidas serán implementadas:

Dado que no existen parientes silvestres o especies compatibles sexualmente con el algodón en el área de actividad utilizadas por la compañía en esta región, el único algodón con el cual podría cruzarse son otros cultivos comerciales. Para evitar la dispersión del algodón 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. El algodón es una planta que no se reproduce vegetativamente cuando crece en el campo, de tal manera que la única forma de que el algodón transgénico sobreviva es mediante la diseminación por semilla.
- ✓ Realizar un programa de monitoreo de voluntarios en las áreas donde se siembre el algodón biotecnológico durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento GLT y procediendo a su destrucción por medios químicos o manuales.
- ✓ Si bien el polen de algodón es muy pesado y pegajoso y no es transportado por el viento, 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 bellotas abiertas causadas por el viento.

El acceso a los lotes donde se siembra material regulado estará restringido solo 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).

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

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 algodón GLT se procederá a la integración de un registro de quien o quienes 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).

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

La zona donde se pretende liberar el algodón GLT está bien caracterizada. Existe el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V. de liberar el algodón GLT 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 algodón convencional alrededor de la superficie sembrada con el algodón GM, como medida de contención. Además, se informará de dicha liberación a los agricultores vecinos de los predios en los que se sembrará el algodón GLT. Lo anterior tendiente a mantener claramente definidos los sitios de liberación.

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

No aplica. Los algodones que expresan las proteínas Bt tiene una historia larga de uso seguro y un análisis de riesgo ha demostrado que el algodón GlyTol® no posee algún riesgo para el ambiente, ni para la flora o la fauna. El algodón GLT sólo se distingue de su contraparte convencional por la resistencia que presenta al ataque de insectos lepidópteros y por la tolerancia que tiene a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, atributo conferido por la expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, PAT y 2mEPSPS.

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

El algodón GLT será destruido una vez realizadas las evaluaciones. Las muestras de bellota que serán utilizadas para el análisis de la calidad de fibra serán también destruidas, una vez que éste concluya.

V. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROMOVENTE

V.a Descripción de la zona en donde se realizó la liberación

El algodón que porta genes de resistencia a insectos ha sido aprobado comercialmente en varios países y ha sido liberado de manera experimental en México bajo los nombres de Bollgard® y Bollgard II®. Los progenitores que originaron al algodón TwinLink™ y el mismo algodón TwinLink™ han sido liberados experimentalmente en los Estados Unidos y ya se ha obtenido su desregulación.

El algodón TwinLink™ también expresa la proteína PAT, componente central del algodón Liberty Link®, tolerante al herbicida glufosinato de amonio, el cual ha sido aprobado y liberado en varios países:

- ☑ En USA, the Animal and Plant Health Inspection Service (US Department of Agriculture) aprobó la siembra comercial, y la Food and Drug Administration aprobó para consumo humano y animal en 2003, se anexan los documentos de aprobación en la carpeta de referencias (**USDA notification and FDA notification**). También pueden consultarse directamente en la página Web de dichas oficinas de gobierno de USA.
- ☑ En Korea se aprobó la liberación comercial del algodón Liberty Link® y para consumo humano en 2005
- ☑ En Japón también ha sido aprobado para liberación comercial y para consumo humano y animal– the Japanese Ministries of Agriculture, Forestry and Fisheries 2006, y Health, Labour and Welfare - a principios de 2006.
- ☑ En Australia, la liberación comercial del algodón Liberty Link® fue aprobada en 2006 por “The Office of the Gene Technology Regulator, Australia”.
- ☑ El algodón GlyTol® también ha sido liberado experimentalmente en los Estados Unidos de América y ha sido desregulado recientemente (Se anexa copia de la notificación del USDA en la carpeta de referencias con el nombre de **USDA notification_GlyTol (GHB614).pdf**).

El algodón GLT es producto de la cruza convencional de los eventos GlyTol® x TwinLink™ por lo tanto no está sujeto a la reglamentación aplicable en todos los países, para mayor información se presenta a continuación el estatus de autorización del evento combinado de algodón y de los eventos parentales:

Tabla 15. Estado de autorizaciones de los eventos parentales del algodón GlyTol® x TwinLink™

Evento	Estado	Fecha de Autorización	País	Compañía
TwinLink® (BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8)	Autorizado para uso y/o consumo humano y/o animal, y procesamiento de alimentos	Diciembre 2011 y Enero 2012	Estados Unidos[1] Canada[2]	Bayer CropScience
GlyTol® (BCS-GHØØ2-5)	Autorizado para uso y/o consumo humano y/o animal, y procesamiento de alimentos	22 de Septiembre 2012	México	Bayer de México S.A. de C.V.

Tabla 16. Estatus Regulatorio del algodón TwinLink® en otros países[3]

País	Autoridad	Estatus
Estados Unidos	Food and Drug Administration	Evaluación de riesgos terminada: Autorizado
Canadá	Canadian Food Inspection Agency	Evaluación de riesgos terminada: Autorizado

En la carpeta de Anexos y Referencias se incluye la información referente a las autorizaciones por parte de los organismos correspondientes.

El algodón modificado genéticamente con los eventos combinados TwinLink™ y GlyTol® ha obtenido la total aprobación para cultivo en Estados Unidos de América, sin embargo se encuentra aún en pruebas experimentales en los Estados Unidos de América este año.

[1] http://cera-gmc.org/docs/decdocs/09-053-002.pdf

[2] http://cera-gmc.org/docs/decdocs/09-054-005.pdf

[3] http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database

V.b Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna;

El algodón GLT tiene únicamente dos ventajas competitivas en relación al algodón no genéticamente modificado en la presencia de aplicaciones de glufosinato de amonio y glifosato y su capacidad de resistir el ataque de insectos lepidópteros. En ausencia de exposición a los herbicidas mencionados no habrá ninguna ventaja competitiva. Las propiedades heredadas del algodón como cultivo no son alteradas por la tolerancia a estos herbicidas. En el ambiente natural, la capacidad para tolerar aplicaciones de glufosinato y glifosato no conferirá ninguna ventaja selectiva para el algodón GLT. El algodón tiene muy pocas características que son importantes para que una planta sea considerada como una maleza y el potencial de convertirse en maleza es poco probable, aún en situaciones donde la competencia con otra maleza sea reducida.

Tres posibles interacciones con otros organismos se han estudiado. La modificación genética, la tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, no cambia la interacción de las variedades de algodón GM con otros organismos en la ausencia de aplicación de los herbicidas. Bajo condiciones agrícolas en donde se use el herbicida pueden obtenerse algunas ventajas en la dinámica de la población de plantas (el efecto buscado es el control de maleza), además en hábitats fuera de la condición agrícola la interacción con otras comunidades de plantas es como cualquier otro algodón.

Una cantidad considerable de organismos puede ser expuesta directamente por la relación con organismos que se alimentan de plantas de algodón GM, o indirectamente a través de consumir organismos que se alimentan de plantas de algodón GM. Estos organismos incluyen a invertebrados, vertebrados y microorganismos.

El tejido de algodonero (de plantas GM y convencionales) particularmente las semillas, puede ser tóxico a mamíferos si es ingerido en altas cantidades debido a la presencia factores tóxicos y antinutricionales incluyendo al gosipol y ácidos grasos ciclopropenoides (ej. Dihidrostercúlico, estercúlico malválico). Los resultados han demostrado que los niveles de estos compuestos son similares en materiales GM con respecto a sus contrapartes convencionales.

Generalmente los mamíferos evitan alimentarse de plantas de algodón. La presencia de gosipol y de ácidos grasos ciclopropenoides en la semilla de algodón limita el uso de la semilla completa como un suplemento proteico en la alimentación animal, excepto para el ganado que resulta menos afectado por dichos componentes. La desactivación o eliminación

de estos componentes durante el procesamiento permite una cantidad de harina de semilla de algodón para alimento de peces, puercos y aves de corral.

No se espera que la semilla de algodón y el polen penetren en hábitats acuáticos en cantidades significativas; por ello el nivel de exposición a vertebrados acuáticos será baja. La disponibilidad limitada de agua y su manejo minimizan el desplazamiento de la semilla hacia cuerpos naturales de agua.

Los valores de toxicidad de las proteínas PAT y 2mEPSPS indican que presentan una toxicidad extremadamente baja para vertebrados. Además de esto y dado que estas proteínas se encuentra en forma natural en el ambiente, no se espera que la misma sea una fuente novedosa de daño o riesgo para vertebrados.

En los Estados Unidos de América, con base en el análisis de los datos sometidos por Aventis (ahora Bayer CropScience), revisión de otra información científica, pruebas de campo del algodón LL25® y comentarios enviados por el público, APHIS (Animal and Public Health Information System) ha determinado que el algodón LL25®: 1) No exhibe propiedades patogénicas; 2) No presenta mayor probabilidad de convertirse en una maleza que la línea parental no transgénica u otro algodón cultivado; 3) Es improbable que incremente el potencial de convertirse en maleza de cualquier otra especie cultivada o silvestre con la cual pueda entrecruzarse; 4) No causará daño a productos agrícolas procesados o crudos; 5) No causará daño a especies amenazadas o en peligro de extinción u organismos que son benéficos para la agricultura; y 6) No deberán reducir la habilidad de controlar plagas y maleza en algodón y otros cultivos. Por lo tanto, APHIS ha concluido que el algodón LL25® y cualquier progenie derivada de cruzas híbridas con otras variedades convencionales será tan seguro de cultivar como el algodón en cultivo tradicional.

El algodón GlyTol® ha sido probado en campo en los Estados Unidos de América y se ha concluido que exhibe una equivalencia agronómica con su contraparte no modificada. Similarmente, la Canadian Food Inspection Agency (CFIA) ha determinado que el algodón GlyTol® no muestra ninguna característica adicional y es sustancialmente equivalente al algodón comercial, en términos de su uso específico y seguridad para el ambiente y para la salud humana y animal.

Se ha efectuado una evaluación de riesgo para las especies no blanco en el algodón TwinLink™ y en las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae que éste produce. Cada evaluación incluyó: identificación del peligro, exposición, prueba de especies potencialmente expuestas y, de ser necesario, una evaluación de dosis-respuesta para las especies afectadas.

El modo de acción de las proteínas Cry en los organismos blanco es entendido muy bien y es mediado por medio de la unión de las proteínas en el intestino, lo cual tiene mucha variabilidad ínter específica. Existe mucha información detallada acerca de la especificidad de las proteínas Cry para un rango muy restringido de especies de insectos. El espectro de acción de las proteínas Cry1Ab y Cr2Ab incluye sólo insectos lepidópteros y no existe evidencia de toxicidad para otros organismos no blanco. Es prudente, sin embargo, identificar a aquellos organismos que muy probablemente estén en contacto con las plantas de algodón y evaluar su sensibilidad a la las proteínas Cry producidas por el algodón TwinLink™.

Las rutas principales de exposición para los organismos no blancos son:

- Alimentación por insectos herbívoros u otros animales
- Prelación de insectos que se han alimentado del algodón Bt
- Consumo de semillas de algodón (pájaros, mamíferos)
- Transferencia de polen
- Caída de hojas
- Incorporación de plantas senescentes por medio del barbecho

Los insectos son los organismos que más probablemente tendrán exposición significante al algodón TwinLink™ ya sea por alimentación directa de las plantas o polen, o por la alimentación de otros insectos, los cuales se han alimentado de las plantas de algodón. Las proteínas Cry han sido estudiadas extensivamente por muchos años en muchas especies de insectos. Bayer CropScience generó datos adicionales sobre los efectos del algodón TwinLink™ en especies de insectos representativos de los insectos encontrados en las plantas de algodón. No se observaron efectos en el insecto depredador *Coleomegilla maculata* (catarinita) o en abejas las cuales pudieron haber estado expuestas a las plantas de algodón TwinLink™.

Existe también la posibilidad de exposición de organismos habitantes del suelo al material vegetativo. Esta exposición será muy limitada puesto que las proteínas Cry tienen una vida muy corta en el suelo, de aproximadamente tres días. Ambas proteínas fueron también probadas en contra de *Folsomia candida* (colémbolo) debido a que estos organismos juegan un papel importante en la descomposición del material vegetal en el suelo. Ninguna de las dos proteínas tuvo un efecto significante en esta especie de colémbolo a concentraciones ambientales relevantes. Un estudio adicional usando tejido de las hojas del algodón TwinLink™ también indicó que no hubo un efecto significativo. Datos generados previamente indicaron que la proteína Cry1Ab posee un riesgo mínimo para las lombrices del suelo y datos generados por Bayer CropScience confirman que la proteína Cry2Ae también posee un riesgo muy bajo para estos organismos.

Algún tipo de exposición a las aves y vida silvestre en los campos de algodón podría ocurrir pero los estudios indican que las proteínas Cry1Ab y Cry2ae no son intrínsicamente tóxicas para las aves o los mamíferos. El riesgo de exposición a los organismos acuáticos es extremadamente bajo. Existe sólo una pequeña posibilidad de exposición por la desviación de polen hacia las corrientes o ríos pero el polen del algodón es pesado y pegajoso lo cual no le permite viajar lejos de los campos de algodón. Los niveles de expresión de las proteínas Cry en el polen son muy bajos y cualquier exposición sería mínima.

Por lo anterior, se concluye que el algodón TwinLink™ y las proteínas que expresa poseen un riesgo muy bajo para los organismos no blanco.

Debido a que el algodón GLT fue generado por métodos tradicionales de cruzamiento entre el algodón TwinLink™ y el algodón GlyTol®, se espera que sea tan inocuo como sus progenitores.

V.c Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGM´s presentado en el país de origen, cuando haya sido requerido por la autoridad de otro país y se tenga acceso a él (descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad)

Como se desprende del inciso anterior, ni el algodón TwinLink™ ni el algodón GlyTol® representan riesgo alguno para el ambiente, ni para la flora o la fauna. Por lo tanto, los resultados de liberaciones experimentales tanto en el país de origen como en otros, muestran que algodón TwinLink™ es igual que sus progenitores y por consiguiente seguro.

V.d. En caso de que el promovente lo considere adecuado, otros estudios o consideraciones en los que se analicen tanto la contribución del OGM a la solución de problemas ambientales, sociales, productivos o de otra índole

- ✓ **Manejo de plagas**

Entre las principales plagas lepidópteras del algodonero se encuentran el complejo bellotero *(Heliothis virescens* Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie), el gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith). El control de estas plagas se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro (cuadro 12), los cuales han tenido un impacto negativo en el ambiente y el uso irracional de estos productos ha generado resistencia en las plagas a un gran número de insecticidas (Pacheco, 1994; Hake *et al.,* 1996; Machain *et al.,* 1988; Machain *et al.,* 1995).

Durante el periodo de evaluación experimental de la tecnología Bollgard® en México, se ha observado una reducción consistente en la cantidad de insecticidas utilizados en la producción de algodón. La reducción en el uso de insecticidas contribuye a conservar los combustibles que de otra manera tendrían que consumirse para la transportación y aplicación de insecticidas. Las materias primas y grandes cantidades de agua necesarias para manufacturar y aplicar insecticidas también pueden ser conservadas. Recursos para transportación y espacio previamente utilizado en la aplicación de insecticidas también es liberado para otros usos. La reducción en el uso de insecticidas en algodón Bollgard®

contribuye a reducir la posibilidad de contaminación del suelo, agua y aire y disminuye significativamente las grandes cantidades de envases de plástico en el campo.

La tecnología Bollgard® y otras tecnologías de resistencia a insectos como la que posee el algodón GLT son totalmente compatibles con los principios del manejo integrado de plagas (MIP), debido a que la tecnología de resistencia a insectos controla únicamente algunas especies de lepidópteros, por lo cual muchos insectos benéficos además de no ser afectados por la tecnología son beneficiados por la reducción en el uso de plaguicidas en el cultivo.

Tabla 17. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodonero (CICOPLAFEST, 1998; SAGAR, 2000; PLM, 2006)

Ingrediente Activo	Categoría Toxicológica	Grupo Químico
Acefate	Ligeramente tóxico	Organofosforado
Azinfos metilico	Altamente tóxico	Organofosforado
Betaciflutyn	Ligeramente tóxico	Piretoride
Bifentrina	Ligeramente tóxico	Piretroide
Carbaril	Moderadamente tóxico	Carbamato
Cipermetrina	Moderadamente tóxico	Piretroide
Clorfenapir	Ligeramente tóxico	Pirrol
Clorpirifos etil	Moderadamente tóxico	Organofosforado
Cyflutrin	Ligeramente tóxico	Piretroide
Deltametrina	Ligeramente toxico	Piretroide
Endosulfán	Altamente tóxico	Organoclorado
Fenpropatrin	Altamente tóxico	Piretroide
Fenvalerato	Ligeramente tóxico	Piretroide
Fluvalinato	Moderadamente tóxico	Piretroide
Lambda cyalotrina	Ligeramente tóxico	Piretroide
Malation	Ligeramente tóxico	Organofosforado
Metidation	Altamente tóxico	Organofosforado
Metomil	Altamente tóxico	Carbamato
Monocrotofos	Extremadamente tóxico	Organofosforado
Paratión metílico	Extremadamente tóxico	Organofosforado
Permetrina	Moderadamente tóxico	Piretroide
Profenofos	Moderadamente tóxico	Organofosforado
Spinosad	Ligeramente tóxico	Derivado de fermentación bacteriana (Naturalyte)
Thiodicarb	Moderadamente tóxico	Carbamato
Triazofos	Altamente tóxico	Organofosforado

El algodón GLT expresa las proteínas insecticidas Cry1Ab y Cry2Ae, las cuales actúan de manera específica sobre algunas especies de lepidópteros que son plagas de importancia económica en el cultivo del algodonero, tales como el complejo bellotero (*Heliothis virescens* Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith)

La expresión de dos proteínas insecticidas que actúan en forma independiente en una misma planta, se constituye en una nueva herramienta para retrasar de manera efectiva la aparición de resistencia a las toxinas de Bt en las poblaciones de insectos plaga. Adicionalmente y con la finalidad de disminuir la posibilidad de resistencia se siembra una porción de la superficie cultivada con algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis* que servirá como área de refugio, la cual sirve como una reserva natural de insectos susceptibles, permitiendo así que la eficacia de las proteínas insecticidas se mantenga por mucho tiempo.

- ✓ **La naturaleza de la resistencia en insectos.**

La resistencia de insectos a proteínas insecticidas no es específica de los cultivos Bt.

La aspersión de insecticidas formulados a base de Bt en una amplia variedad de cultivos, presenta un riesgo equivalente o mayor de desarrollo de resistencia debido a las altas dosis y al uso irracional de estos productos (Roush, 1994).

Los factores que contribuyen al desarrollo de resistencia en insectos a los cultivos que expresan proteínas Bt, son los mismos factores que afectan el desarrollo de resistencia a los insecticidas convencionales, tales como:

- La naturaleza, eficacia y modo de empleo del producto para cultivos Bt.
- Nivel de expresión (dosis requerida para controlar todos o la mayoría de los insectos heterocigotos, de tal manera que la resistencia es un fenómeno funcionalmente recesivo).
- Superficie sembrada con cultivos Bt en un área determinada.
- Genética de la resistencia (frecuencia inicial de alelos de resistencia, grado de dominancia de dichos alelos, costo fisiológico de la resistencia).
- Comportamiento de los insectos (movimiento y reproducción).

- El modo en el que los insectos se mueven entre los cultivo Bt y convencionales determina el nivel de exposición de los insectos a la toxina Bt, así como la probabilidad de cruzamiento entre insectos resistentes y susceptibles.
- Estudios realizados en maíz y algodón indican que los insectos tienden a dispersarse en grandes distancias (FIFRA SAP, 1998).

Los estudios científicos indican que los alelos para un alto nivel de resistencia a las proteínas Bt son básicamente recesivos (Gould *et al*., 1997; Liu *et al*., 1999; Tabashnik, 1994; Tabashnik *et al*., 2000).

Por lo tanto para que un insecto sea totalmente resistente a Bt, debe ser homocigoto para el alelo de resistencia y se ha observado que la frecuencia de alelos de resistencia es relativamente baja en las poblaciones de insectos (EPA, 2001).

- ✓ **Estrategias para retrasar el desarrollo de resistencia en insectos.**

Para reducir la probabilidad de selección de resistencia en insectos se utilizan estrategias de manejo integrado de plagas (MIP), basadas principalmente en la expresión adecuada de la proteína insecticida para el control de la plaga y en la siembra de algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis* como áreas de "refugio" (Carrière *et al.*, 2001).

El concepto de refugio considera que los alelos de resistencia se presentan a un nivel muy bajo (en el orden de 1 en 1000 o menor). A este nivel, la gran cantidad de insectos susceptibles producidos en el refugio pueden diluir cualquier eventual insecto resistente que se produzca en el algodón Bt (Gould *et al.*, 1997; Andow *et al.,* 2000).

En los refugios se producirán insectos sin historial de selección por las toxinas Cry1Ab y Cry2Ae, mismos que al dispersarse como adultos se cruzarán con insectos que eventualmente fueran seleccionados como resistentes en el algodón GLT.

La SAGARPA recomienda un refugio 80:20: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bt, el productor se compromete a sembrar 10 ha con variedades de algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis*, asperjadas con cualquier insecticida para el control de gusano bellotero y rosado, excepto el uso de insecticidas biológicos a base de *Bacillus thuringiensis.*

En su caso un refugio 96:4: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bt el productor deberá sembrar 1.6 ha con variedades de algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis*, que serán asperjadas con cualquier insecticida convencional, excepto biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* y los insecticidas usados específicamente para el control de complejo bellotero y gusano rosado. Algunos ingredientes activos que no podrán ser utilizados por el productor en esta opción de refugio son acefate, Bt, clorpirifos etil, fenvalerato, metomil, monocrotofós, sulprofos, thiodicarb, profenofos y piretroides sintéticos (cyflutrina, bifentrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina, lambda cyhalotrina, tralometrina y otros).

- ✓ **Estrategia de manejo de la resistencia en insectos (MRI) basada en la expresión de dos proteínas insecticidas.**

La estrategia utilizada para el MRI en cultivos que expresan proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) combina una expresión óptima de la proteína insecticida en las plantas transgénicas con el establecimiento en el cultivo de un porcentaje de plantas no transformadas que se constituyen en "refugio" para favorecer la presencia y multiplicación de insectos susceptibles. La proteína insecticida se expresa en las plantas transgénicas a un nivel suficiente para controlar los insectos blanco susceptibles así como los insectos blanco heterocigotos para el carácter de resistencia. El racional de esta estrategia es que cualquier insecto resistente homocigoto que aparezca en la población y sobreviva a la proteína insecticida tenga oportunidad de cruzarse con la población de insectos susceptibles relativamente alta que se multiplica en el refugio, produciendo descendencia de individuos susceptibles heterocigotos que pueden ser controlados por el cultivo transgénico.

Otra alternativa para mejorar el control de insectos por proteínas Bt al tiempo que retrasa la aparición de resistencia consiste en introducir una segunda toxina insecticida, ya sea para alternar o bien combinar con la proteína insecticida original. Si la segunda proteína insecticida posee un mecanismo de acción suficientemente diferente al mecanismo de la primera, y además es por sí misma eficiente para controlar los insectos plaga, entonces los insectos deberán desarrollar dos modos diferentes de resistencia para sobrevivir a ambas toxinas.

- ✓ **Manejo de la maleza**

Uno de los mayores beneficios de las tecnologías de tolerancia a herbicidas, ha sido la adopción de sistemas de labranza reducida, es decir, menos pasos de labranza. Esta

reducción hace que el suelo esté más protegido, se erosione menos y conserve la humedad y la materia orgánica se descomponga y se integre al suelo. El porcentaje de incremento de este sistema ha sido más alto en algodón que en ningún otro cultivo debido a la adopción tan alta de tecnologías de tolerancia a herbicidas, incrementos en el precio del diesel, mejores herbicidas que controlan el mayor espectro de malezas con mayor efectividad. Sin embargo, la principal razón de este incremento en prácticas de labranza reducida ha sido la disponibilidad de las tecnologías de tolerancia a herbicidas (Sankula, 2006).

Los cambios que la biotecnología agrícola ha inducido por el volumen y toxicidad de los herbicidas no son todavía bien conocidos, sin embargo, un estudio muy reciente concluye que los cultivos tolerantes a herbicidas tienen el potencial de reducir la contaminación y mitigar el impacto ambiental de otros pesticidas en la producción agrícola (Hoyle, 1993; Conko, 2003; Margriet, 1998 y Brookes y Barfoot, 2005).

El herbicida Glufosinato de amonio en algodón tiene ventajas competitivas con relación a otros herbicidas como el glifosato, paraquat y diquat. Sin embargo, también compite con otros herbicidas residuales que se usan en cultivos perennes y hortalizas. Glufosinato de amonio tiene muchas ventajas competitivas sobre dichos herbicidas para el manejo de maleza. Esto es debido a sus propiedades moleculares y a su modo de acción particular. Las principales ventajas comprenden:

a. Su seguridad relativa para los cultivos en situaciones donde es difícil evitar el contacto o deriva del producto con el cultivo: hortalizas, plántulas o en cultivos cubiertos por la maleza.
b. Puede usarse en plantaciones jóvenes con hojas cercanas a la superficie del suelo.
c. Su seguridad con respecto a las plantas madre en plantaciones como el banano.
d. En viñedos puede ser usado en ambientes con restricciones de manejo ecológico.
e. Puede ser usado en situaciones donde se requiere un manejo de la cubierta vegetal para evitar la erosión.

En cuanto al comportamiento del herbicida en el ambiente, se sabe que en plantas después de la aplicación ocurre una rápida degradación del ingrediente activo en el suelo. La

absorción de los productos de degradación por las plantas en suelos tratados es muy pobre. El mayor metabolito encontrado es el MPP (3-methylphosphinico-propionic acid). Se ha encontrado en estudios con carbono 14 que estos productos de degradación se incorporan al metabolismo de las plantas y producen compuestos naturales. En plantas tolerantes, la sustancia activa se desintoxica rápidamente por acetilación y formación de N-acetyl-glufosinate (NAG).

En animales, varios estudios han demostrado que el glufosinato de amonio es pobremente absorbido después de administración oral. Es eliminado rápidamente principalmente en forma parental. La mayoría es excretada en una cantidad de 90% o más de la dosis administrada. El metabolito principal encontrado en estos estudios es el MPP.

En el suelo, en presencia de microorganismos, el glufosinato de amonio es rápidamente degradado a dos metabolitos principales, 3-methylphosphinico-propionic acid (MPP) and 2-methylphosphinicoacetic acid (MPA). Estudios de laboratorio han demostrado que el glufosinato de amonio se degrada rápidamente en el suelo a 20 °C bajo condiciones aerobias, con una degradación media de 2 a 8 días. En el caso de los metabolitos MPP and MPA, la vida media es de 13 días (rango 6 a 38) y 8 días (rango 1 a 19 días) respectivamente.
Basados en estos valores, ni el ingrediente activo ni los principales metabolitos pueden considerarse como persistentes. En el agua, el metabolismo es el mismo que el que se presenta en el suelo.

Para mayor información puede consultarse el capítulo correspondiente a “Behaviour in the environment” en Technical information (2004).

De la misma manera, el glifosato (N-fosfonometil-glicina) muestra una toxicidad muy baja en mamíferos y una baja persistencia en el suelo. Es altamente biodegradable, no tiene actividad residual y presenta una toxicidad muy baja en los seres humanos y la fauna silvestre (Malik *et al*., 1989).

Por otro lado, en Brookes, G. and P. Barfoot. (2006), se presenta una extensa revisión de lo que ha sucedido en diez años de cultivos GM en el mundo. Dentro de las conclusiones más importantes se destaca que para el caso de tolerancia a herbicidas:

→ Existe un incremento en la flexibilidad de manejo que viene de la combinación de la facilidad de uso de los herbicidas asociada con la ventana de aplicación postemergente de herbicidas de amplio espectro.

→ Comparado con cultivos convencionales, donde la aplicación postemergente resulta muy complicada y riesgosa, en los cultivos tolerantes GM, esto no representa un problema.

→ En general, el hacer más eficiente el manejo de maleza resulta en menores costos de producción.

→ Debido a la naturaleza de los herbicidas usados con los cultivos GM, se reduce la aplicación de herbicidas muy residuales que pueden afectar el establecimiento de cultivos en ciclos subsecuentes.

Datos duros muestran que ha existido una reducción neta del 15.3% en el impacto ambiental de las áreas de cultivo debidas al uso de cultivos GM desde 1996. El volumen total de ingrediente activo aplicado a los cultivos se ha reducido en 7%;

La tabla siguiente resume de manera concisa los beneficios ambientales obtenidos por el uso de los cultivos GM en el mundo. El caso del algodón resulta evidente la baja adopción de la tecnología (HT Cotton) en los países en desarrollo, evitando tener los beneficios ambientales a los que ya acceden los países desarrollados (99% de reducción en el impacto ambiental).

Tabla 18. Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados

	%total de reducción de impacto ambiental: países desarrollados	*%total de reducción de impacto ambiental: países en desarrollo*
GM HT Soya	53	47
GM IR Maíz	92	8
GM HT Maíz	99	1
GM IR Algodón	15	85
GM HT Algodón	99	1
GM TH Canola	100	0
Total	46	54
Países en desarrollo incluye todas los países en Suramérica		

*Brookes, G. and P. Barfoot. (2006)

En Brookes, G. y P. Barfoot. (2006), se presenta una extensa revisión de lo que ha sucedido con el algodón tolerante a herbicidas obtenido por medio de la biotecnología moderna.
El algodón genéticamente modificado con el evento LL25® (LibertyLink®) de tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y el algodón con el evento GlyTol® no presentan diferencias con respecto a su contraparte convencional en cuanto a su comportamiento agronómico, morfología, desarrollo fenológico, calidad de la semilla y calidad de fibra.

Las variedades de algodón con la tecnología de tolerancia a glifosato (Roundup Ready) de Monsanto han sido utilizadas ampliamente desde hace más de 8 años en México en todas las regiones algodoneras. La tecnología LibertyLink® (evento LL25®) de tolerancia a glufosinato de amonio de Bayer por el contrario, aunque en Estados Unidos fue lanzada casi al mismo tiempo que Roundup Ready, su utilización ha sido poca y reciente.

Bayer de México inició pruebas experimentales de LL25® con el INIFAP desde el año 2003. Durante el tiempo que esta tecnología LibertyLink® (evento LL25® de Bayer) ha sido evaluada no se ha observado algún efecto adverso al ambiente, ni alteración o daño en la diversidad biológica; así como ningún efecto dañino a la sanidad animal, vegetal y acuícola. Esto se ha observado consistentemente en todas las regiones del mundo donde se ha sembrado y se siembra el algodón LL25® de Bayer (ej. Estados Unidos, Australia).

En México se han efectuado liberaciones experimentales en las regiones algodoneras del Sur de Tamaulipas, La Laguna, Chihuahua y Mexicali. Los resultados de los trabajos no mostraron efectos fitotóxicos del glufosinato de amonio en las variedades tolerantes a este herbicida, las cuales mostraron una fenología y rendimiento similar a las variedades convencionales sin la aplicación de glufosinato. Las variedades convencionales fueron severamente dañadas (>60%) por la aplicación de glufosinato a las dosis evaluadas. De manera general, los resultados de los trabajos mencionados sobre el uso de las variedades tolerantes a glufosinato y el uso del herbicida en México constituyen una buena alternativa para el control postemergente de maleza en algodonero (Rosales, 2005).

Las tecnologías de tolerancia a herbicidas derivadas de la biotecnología, han llevado al control de malezas a una nueva era. Los beneficios de las tecnologías de tolerancia a herbicidas que se han observado son:

- ☑ La facilidad y seguridad del cultivo para los agricultores del sistema comparado con otros controles como el manual, mecánico y herbicidas selectivos o residuales (Sankula, 2006).
- ☑ Los costos de producción también han decrecido ya que los agricultores tienen que hacer menos pasos de maquinaria en el cultivo, menos limpias manuales, y aplicación de otros herbicidas con menor espectro de control y eficacia (Sankula, 2006).
- ☑ El cultivo del algodón no se daña, mientras que el convencional puede dañarse con una mala aplicación de herbicidas selectivos o residuales, pasos de maquinaria y limpieza manual con azadón también dañan las raíces del cultivo.
- ☑ No quedan malezas en la línea del cultivo como quedan con el control manual y mecánico.
- ☑ Se pueden necesitar menos aplicaciones de herbicidas que con el algodón convencional porque los herbicidas que se utilizan en los cultivos tolerantes a herbicidas son de amplio espectro y pueden aplicarse a cualquier altura o etapa de desarrollo del cultivo, de tal forma que la aplicación esta en función del problema, la maleza, por lo que son más efectivos.
- ☑ El cultivo de algodón con la tecnología de tolerancia a herbicidas hará que el cultivo esté limpio, sin competencia con la maleza, durante todo el ciclo. Al competir menos con la maleza, los cultivos pueden incrementar su potencial de rendimiento con relación a su contraparte convencional, aunque esto depende del buen manejo del agricultor.
- ☑ La fibra tendrá menos residuos de maleza y por lo tanto, menos castigos en el precio por calidad.

Aunque ambas tecnologías, tanto la de Roundup Ready de Monsanto como la de LibertyLink® de Bayer, son de tolerancia a herbicidas, los herbicidas a los que el cultivo de algodón es tolerante tienen modos de acción diferentes. Tanto glifosato como glufosinato son herbicidas post-emergentes, no residuales, no selectivos, de aplicación total al cultivo que tienen las respectivas tecnologías. Sin embargo, hay grandes contrastes entre los dos sistemas de control de malezas. El herbicida glufosinato de amonio presenta un espectro de control diferente al glifosato; es decir, su efectividad es menor contra algunas especies de hoja angosta como el zacate Johnson (*Sorghum halepense*, Fam. Poaceae), el Coquillo (*Cyperus esculentus*, *Cyperus rotundus*, Fam. Ciperaceae) y bajo ciertas circunstancias contra el Quelite (*Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus hybridus*, Fam. Amaranthacea). Por otro lado, Glufosinato de amonio presenta un amplio espectro de control contra especies de hoja ancha que Glifosato, por ejemplo contra malezas como Correhuela (*Convolvulus arvensis*, Fam.

Convolvulácea), Malva (*Malva parviflora*, Fam. Malvacea), Cadillo (*Xanthium strumarium*, Fam. Asteraceae) y Amargosa (*Parthenium hysterophoru*), Fam. Asteraceae) entre otras.

El algodón GLT constituye una opción tecnológica excelente para el agricultor puesto que combina las tecnologías de control de plagas y tolerancia a dos herbicidas con modos de acción diferentes con las ventajas que tiene la flexibilidad del uso de los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, lo cual permitirá un control más efectivo de la maleza.

V.e En caso de importación copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen.

El algodón TwinLink™ ha sido liberado de manera experimental en los Estados Unidos de América y fue desregulado a finales del año pasado; en la Carpeta de Anexos y Referencias se incluye la Notificación del estado No-regulado del mismo (**TL-dereg-2011-26349.pdf**), publicado el 12 de octubre de 2011 en el Registro Federal (Federal Register). Por lo que respecta al algodón GlyTol®, USDA ha determinado que ya no es un evento regulado (**USDA notification GlyTol (GHB614).pdf)**.

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

Desde tiempos primitivos, el hombre ha combatido las malas hierbas de acuerdo a las posibilidades tecnológicas. La limpieza del terreno, el deshierbe y la recolección constituían el insumo más importante de la producción del cultivo, que a veces tomaba hasta el 75% de todo el tiempo disponible; por esta razón, una familia no podía cultivar más de 0.5 ha. de tierra (Frisbie y El-Zik, 1989).

Tanto los métodos como su forma de implementación han ido evolucionando al paso del tiempo gracias a los avances que se han obtenido a través de instituciones públicas y de organizaciones privadas, con lo cual en la actualidad se puede intentar resolver el problema

desde varias vías que incluyen desde métodos mecanizados hasta el uso de productos químicos.

A. Control mecánico. Este tipo de control utiliza la labranza como técnica de entierro y/o siega de las malas hierbas. Los barbechos y rastreos previos a la siembra contribuyen eficazmente en el control de la maleza presente en el terreno; después de la siembra es necesario realizar laboreo de aporque después de cada uno de los primeros riegos de auxilio (hasta que la altura del cultivo permita el paso de maquinaria), con lo cual se resolverá el problema presente en las calles, sin embargo, queda el problema de la maleza que se desarrolla entre las plantas de algodonero (Aldaba, 1992).

El laboreo es una práctica de control razonablemente efectivo contra especies anuales, siempre y cuando evite la floración y producción de semillas de las mismas; sin embargo, es relativamente inefectivo contra especies perennes (Muzik, 1970).

En Kansas (NAS, 1980), 16 operaciones de labranza a intervalos de 12 días después del brote erradicaron *Convolvulus arvensis*. El requisito esencial para la erradicación de *C. arvensis* es programar la labranza en relación con el agotamiento de las reservas alimenticias de sus raíces (NAS, 1980), y el laboreo deberá empezar no más tarde que el inicio de brotación de *C. arvensis*; después del corte, las pérdidas de reservas a partir de las raíces continúan por dos semanas, antes de que las hojas envíen alimento hacia las raíces, por lo cual el laboreo deber programarse a intervalos entre 14 y 18 días después del brote (Philips and Timmons 1954, citados por Muzik, 1970; NAS, 1980).

B. Control manual. Consiste en la utilización del azadón para controlar la maleza que se desarrolla entre las plantas de algodonero, y son necesarios de dos a tres deshierbes, realizando cada uno después de los dos o tres primeros riegos de auxilio, suficientes para mantener el terreno libre de malezas durante el período crítico.

Sin embargo, al presentarse especies perennes su eficiencia es limitada. En un estudio conducido durante seis años en vid en el Valle del Yaqui, se reportó 75% de control de *C. arvensis* mediante el uso exclusivo de desmalezado mensual con azadón durante los seis años de estudio.

C. Control cultural. No siempre resulta práctica su aplicación; consiste en la implementación de una serie de prácticas de tipo preventivo, dentro de las que se incluyen el lavado de maquinaria utilizada en terrenos altamente infestados, el uso de mayas finas en las entradas de las acequias, la quema de rastrojos fuera del área de cultivo, el control de malezas en áreas aledañas no cultivadas, la rotación de cultivos, etc. La rotación de cultivos permite las siguientes opciones:

- Los cultivos distintos permiten la rotación de herbicidas con diferente modo de acción.
- El periodo de crecimiento de la maleza puede ser evitado o alterado.
- Cultivos con distintas fechas de siembra y diferente preparación del suelo pueden permitir variar las técnicas culturales para controlar un problema particular de malezas.
- Los cultivos también difieren en su competencia con las malas hierbas. Un cultivo fuertemente competidor tendrá más probabilidades de restringir la producción de semillas de la flora arvense. (Comité de prevención de resistencia a herbicidas (Guía para el manejo de resistencia a herbicidas en: **http://www.plantprotection.org/hrac/Cindex.cfm?doc=spanish_guia.html**)

D. Control químico. Consiste en la aplicación de productos químicos denominados Herbicidas, los cuales deberán ser autorizados para su uso en cada cultivo por la Dirección General de Sanidad Vegetal.

Existen varias formas de clasificar los herbicidas, incluyendo como se usan, sus propiedades químicas y su modo de acción (FAO, 1996).

Su uso hasta cierto punto empírico y rutinario ha permitido buenos resultados aplicando únicamente la tecnología proporcionada por la empresa manufacturera; sin embargo, las respuestas son variables debido a características regionales de clima, suelo y especies por controlar, por lo cual es necesario conocer la absorción, transporte y acción fisiológica de ellos.

El sistema de control químico solo controla las malas hierbas hasta el cierre del cultivo en la mayoría de los casos, por lo tanto, las nuevas generaciones que se establecen en épocas posteriores dificultan considerablemente la cosecha; a este respecto y por sus características, la correhuela perenne es de considerable importancia.

Para el control de *C. arvensis*, se ha encontrado que al aplicar 2,4-D los brotes son realmente muertos, pero las porciones bajo el suelo usualmente sobreviven; el mejor control es obtenido mediante aspersiones justo antes de la floración (Muzik, 1970).

Para controlar las plagas del algodonero se utiliza un control químico principalmente. En el inciso anterior se detalla su uso e implicaciones.

Lo descrito anteriormente presenta algunas consideraciones sobre el uso de las alternativas disponibles para contender con el problema del manejo de maleza y plagas en el cultivo del algodonero. Sin embargo, al no usar las tecnologías disponibles como lo es la siembra de cultivos GM como el algodón GLT se están perdiendo varios beneficios como se muestra a continuación.

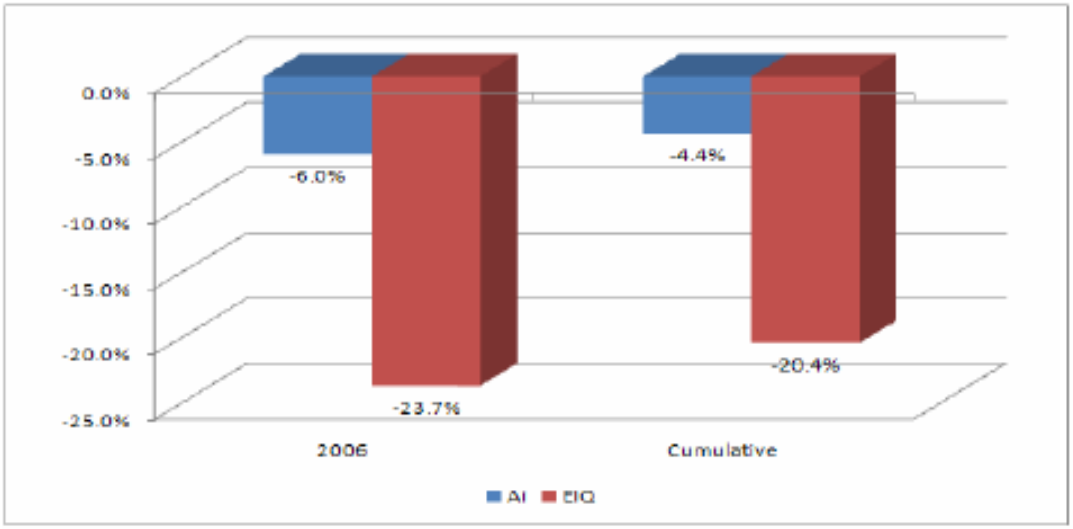


Figura 17. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a los herbicidas en los países que han adoptado esta tecnología de 1996-2006

En este ejemplo se observa la reducción en el uso de herbicidas por efecto de la aplicación de algodón GM con tolerancia a herbicidas en todos los países que han adoptado esta tecnología.

En otro ejemplo se observa que con las técnicas tradicionales de manejo del cultivo se usa mayor cantidad de combustible, lo que significa mayor cantidad de gases expulsados a la atmósfera.

Tabla 19. Consumo de combustible por el uso del tractor, por método de labranza

	Litros/ha
Cultivo tradicional: Rastreo, disco y sembradora, etc	46.65
Cultivo de conservación (RT): arado de cincel, disco y sembradora	28.83
Sin labranza: siembra de la semilla con dos aplicaciones, pre emergencia y pos emergencia	14.12

Fuente: Adaptado de Jasa (2002) y CTIC 2004

En la siguiente tabla puede también observarse el impacto de las tecnologías GM en diversos cultivos con relación a la cantidad de herbicidas e insecticidas que se ha usado desde la introducción de los cultivos GM.

Tabla 20. Impacto de cambios en el uso de herbicidas e insecticidas por la cultivación global de los cultivos GM de 1996 a 2006

Trait	***Cambios en el volumen de ingrediente activo utilizado (millones de Kg)***	***Cambio en el EIQ en el campo (en términos de millones de unidades de campo EIQ / ha)***	***% cambio de uso de la i.a. en los países que cultivan GM***	***% cambio en el impacto ambiental en los países que cultivan GM***
GM Soya tolerante a herbicida	-51.4	-4,865	-4.1	-20.0
GM Maíz tolerante a herbicida	-36.5	-885	-3.4	-4.0
GM Algodón tolerante a herbicida	-28.6	-1,166	-15.1	-22.7
GM Canola tolerante a herbicida	-6.3	-310	-11.1	-22.6
GM Maíz resistente a insectos	-7.0	-103	-4.1	-4.6
GM Algodón resistente a insectos	-94.5	-4,670	-19.4	-24.3
Total	**-224.3**	**-12,259**	**-6.9**	**-15.3**

EIQ= Environmental Impact Quotient (Coeficiente de impacto ambiental)

VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O SE DESTINE A LA BIORREMEDIACIÓN.

El evento genético combinado GLT: GlyTol® TwinLink™ (GHB614 x T304-40 x GHB119) cuenta con la formal autorización No. 123300913X0001 de fecha 14 de septiembre de 2012, expedida por la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

LA PROPUESTA DE VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA

Se solicita el permiso para el año 2015. Este periodo incluye actividades previas a la siembra del algodón GLT 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 del despepite.

A. REFERENCIAS

Abou-Donia, M. B. 1989. Gossypol. In: P. R. Cheeke (ed.) Toxicants of Plant Origin. vol. 4: Phenolics. pp 1–22. CRC Press, Boca Raton, FL.

Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken HC. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. Plant Physiol. 66: 830-834.

Andow, D. A., D. M. Olson, R. L. Hellmich, D. N. Alstad & W. D. Hutchison. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera : Crambidae) *J. Econ. Entomol*. **93**(1): 26-30.

Bayer, E., Gugel, K. H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W.A. and Zähner, H. 1972. Phosphinothricin and phosphinothricyl-alanyl-alanine. Helvetica Chimica Acta, 55(25), 224-239. #A35993

Berardi L.C. and Goldblatt L.A. 1980. Gossypol. *In* Toxic constituents of plant foodstuffs. 2nd Ed., I.I. Liener, ed., Academic Press, New York. 183-237. IRN: M-208032-01-1

Boevink, P., Chu, P. W. G. & Keese, P. 1995. Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. Virology 207, 354±361.

Boocock MR, Coggins JR. 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. FEBS Letters. 154(1):127-133.

Bremmer, J., Ebert, E., Heusel, R., Sochor, H., Sonder, K., Stumpf, K., Weller, O. and Zumdick, A. 1997. Glufosinate-ammonium, code: AE F039866; short summary on the active substance. AgrEvo report no. PSR97/006. #A59530.

Brookes, G and Barfoot, P. 2005a. PG Economics Ltd., Dorchester, UK, GM Crops: The Global Economic and Environmental Impact—The First Nine Years 1996–2004, AgBioForum, 8(2&3): 187-196.

Brooks, G. and Barfoot, P. 2006b. GM Crops: The First ten years-Global Socio-Economic and Environmental Impacts.ISAAA Brief No. 36. ISAAA: Ithaca, NY. 196 p.

Bruce, H.M., Callow, R.K. 1934. LXXV. Cereals and rickets. The role of inositolhexaphosphoric acid. Biochem. J. 28:517 528.

Chaboute M., Chaubet N., Philipps G., Ehling M., Gigot C. 1987. Genomic organization and nucleotide sequences of two *histone H3* and two *histone H4* genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology. 8: 179-191.

Carrière Y, Tabashnik BE. 2001. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proceedings of the Royal Society of London* B 268: 1475-1480.

Chaubet N., Clement B., Gigot C. 1992. Genes encoding a *histone H3.3*-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. J. Mol. Biol. 225, 569-574.

Cherry J.P., Leffler H.R. 1984. Seed. In Cotton (Kohel, R.J. and Lewis, C.F., eds.) Amer. Soc. Agron. Madison, WI. 511-558. # M-208069-01-1

CONABIO. S/F. Algodón (*Gossypim hirsutum*). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). México.16p.

Conko, G. 2003. Competitive Enterprise Institute Director, LOS BENEFICIOS DE LA BIOTECNOLOGÍA, revista Regulation, 1:2003

Currier, 2009. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* combined event GLT (GHB614). Bayer CropScience. Internal report. 30 pages.

De Almeida, E.R.P., Gossele, V., Muller, C.G., Dockx, J., Reynaerts, A., Botterman, J., Krebbers, E. and Timko, M.P. 1989. Transgenic expression of two marker genes under the control of an Arabidopsis rbcS promoter: sequences encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. Mol. Gen. Genet 218, 78–86.

De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J. 1987. Engeneering herbicide resistance in plants by expression of detoxifying enzyme. EMBO Journal. 16:2513-2518.

Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. 1982. Nopaline synthase : transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics, 1, 561-573. # A50621

EPA, 2001. Biopesticides registration action document. *Bacillus thuringiensis* Incorporated Protectants, 10/16/2001. Available at:
http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/reds/brad_bt_pip2.htm.

FAO, 1996. Manejo de malezas para países en desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120)

FIFRA SCIENTIFIC ADVISORY PANEL. 1998. Subpanel on *Bacillus thuringiensis (Bt)* Plant-Pesticides and Resistance Management. http://www.epa.gov/scipoly/sap/1998/

Fretzdorff, B. 1992. Phytinsaeure in Getreidenaehrmitteln - Bestandsaufnahme und Moeglichkeiten der Reduktion. Getreide, Mehl Brot. 46:180-185.

Frisbie R.E., El-Zik K.M. 1989. *Integrated pest management systems and cotton production*. (Wilson L.T., eds). Wiley-Interscience NewYork.

Fryxell, P. 1979. *The Natural History of the Cotton Tribe*. College Station, Texas A&M Press. 245. #M-208062-01-1

Gebhardt, C., Oliver, J.E., Forde, B.G., Saarelainen, R., and Miflin, B.J. 1986. Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. EMBO J. 5:1429-1435.

Gould F, Anderson A, Jones A, Sumerford D, Heckel DG, Lopez J, Micinski S, Leonard R, Laster M. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to Bacillus thuringiensis toxins in field populations of Heliothis virescens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 3519 – 3523

Habex V. 2007. Full DNA sequence of event insert and integration site of Gossypium hirsutum transformation event GHB614. Bayer CropScience. Internal report. 43 pages. #M-278542-02-1

Habex, V.. 2006. Structural stability analysis of GlyTol Cotton event GHB614. Bayer BioScience N.V. Internal Report 2006-GHB614-NAC005. 20 pages.

Habex V., Lecleir M. 2006. Demonstration of the nature of the flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience. Internal report. 49 pages. #M-279393-01-1

Hak, SJ.; Kerby, T.A. and Hake, K.D. 1996. Cotton Production Manual. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3352. USA. 417 p.

Hake, K.D.; Kerby, T.A.; S. Jonson Hake; W. Bentley; P.B. Goodell, and R.N. Vargas. 1996. Cotton crop problems. In Cotton production manual, S. Jonson Hake; Kerby, T.A.; Hake, K.D. (Editors). University of California. Division of Agriculture and Natural Resources.

Harpster, M.H., Townshend, J.A., Jones, J.D.G., Bedbrook, J. and Dunsmuir, P. 1988. Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus, 19, 29, and nopaline synthase promoters in transformed tobacco sugarbeet and oilseed rape callus tissue. Mol. Gen. Genet. 212, 182–190.

Hérouet C. 2004. Assessment of the toxicity and allergenicity of the PAT protein (*bar* gene). Bayer CropScience. Internal report. 41 pages. #C045036.

Hérouet C., Esdaile D.J., Mallyon B.A., Debruyne E., Schulz A., Currier T., Hendrick K., van der Klis R.J., 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: 134–149. C047049.

Hérouet-Guicheney C., Rouquie D., Freyssinet M., Currier T., Martone A., Zhou J., Bates E.E.M., Ferullo J.M., Hendrick K., Rouan D. 2009. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphatesynthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology 54: 143-153. M-349666-01-1.

Höfte H, de Greve H, Seurinck J, Jansens S, Mahillon J, Ampe C, Vandekerckhove J, Vanderbruggen H, van Montagu M, Zabeau M, et al. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of Bacillus thuringiensis berliner 1715. Eur J Biochem. Dec 1;161(2):273–280.

Hoyle, Russ (1993). "Herbicide-Resistant Crops are No Conspiracy." Bio/Technology. Vol. 11. July, pp. 783-784.

Keys, A.J., Bird, I.F., Cornelius, M.J., Lea, P.J., Wallsgrove, R.M. and Miflin, B.J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. Nature, 275, 741-743. # C010220.

Kishore, G. and Shah, D. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitiors as herbecides. Annu. Rev. Biochem. 57:627-663

Lagière, R. 1968. El Algodón. Traducción de Ripoll, V. Blume. Barcelona. 292 p.

Lebrun M., Sailland A., Freyssinet G., Degryse E. 1997. Mutated EPSPS, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene (pp. WO 97/04103)

Lebrun M., Sailland A., Freyssinet G., Degryse E. 2003. Mutated 5- enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. US patent US6566587B1 (20-MAY-2003). BAYER CROPSCIENCE SA (FR).

Lindsey, K. and Jones, M.G.K. 1989. Resistance to herbicides. *In* : Plant biotechnology in agriculture. British library cataloguing in publication data. Open university press. Milton Keynes, 201-208.

Liu, Y.-B., Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Patin, A.L. and Bartlett, A.C. 1999. Development time and resistance to Bt crops. Nature 400: 519.

Machain Lillingston, M.; Díaz Talamante, F.; Guzmán Ruiz, S. 1988. Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali. Campo Agrícola Experimental Valle de Mexicali. INIFAP.

Machain Lillingston, M.; Medina Martínez, R.; Méndez Páramo, P.; Reyes Catalan, R.; De la Cerda López, Raúl; Legaspi Díaz. 1995. Manejo del algodonero para escape al daño de mosquita blanca de la hoja plateada. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California.

Maga J.A. 1982. Phytate: Its Chemistry, Occurrence, Food Interactions, Nutritional Significance, and Methods of Analysis. J. Agric. Food Chem. 30:1-9.

Malik J., Barry G., Kishore G. 1989. The herbicide glyphosate. Biofactors 2:17-25.

Manderscheid, R. and Wild, A. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. Journal of Plant Physiology, 123, 135-142. # A34372.

Margriet, F. Caswell, Keith O. Fuglie, Cassandra A. Klotz. 1998. An Economic Research Service Report Agricultural: Biotechnology An Economic Perspective, USDA ERS. pp. Sept: 35-36

Marshall JS, Stubbs JD, Taylor WC. 1996. Two genes encode highly similar chloroplastic NADP-malic enzymes in Flaveria: implications for the evolution of C4 photosynthesis. Plant Physiol 111: 1251–1261

Mertens, K. and Moens, S. 2008. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 over different generations, in different backgrounds and grown in different environments. Bayer CropScience. Internal report. 27 pages. # BIO2-004.

Michiels, F., Morioka, S., Scheirlinck, T., Komari, t. 1992. Stamen-specific promoters from rice. Patent Application W092/13956A1. Plan Genetic Sistem N.V. (BE)

Miflin, B.J. and Lea, P.J. 1977. Amino acid metabolism. Annual Review of Plant Physiology, 28, 299-329. #C013685

Moens, S. and De Pestel, K. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40. Bayer CropScience. Internal report. 56 pages. # BBS08-002.

Murakami, T., Anzai, H., Imai, S.,Sathah, A., Nagaoka, K. and Thompson, C.J. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of Streptomyces hygroscopicus : Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Molecular and General Genetics, 205, 42-50. # A50613

Muzik, J.J. 1970. Weed Biology and Control. McGraw Hill Book Co; N.Y.

Oberdörfer R. 2003. Nutritional impact assessment report on glufosinate ammonium-tolerant cotton transformation event LLCotton25®. Bayer CropScience. Internal report. 356 pages. #C029575.

Oberdörfer,R. 2007. Nutritional impact assessment report on glyphosate tolerant cotton transformation event GHB614. Bayer CropScience. Internal report. 97 pages. #M-289161-02-1

Oberdörfer, R. 2008. Summary of the Statistical Analysis of Bt Cotton (event GHB119) vs Non-transgenic Counterpart (Coker 312). Dart number: M-303417-01-1.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control protein. 109 pages. DART number: M-299794-01-1.

Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. Nature, 313, 810-812. #A67238.

Pacheco Mendivil, F. 1994. Plagas de los cultivos oleaginosos en México. INIFAP - Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO). Lito-Impresiones-Gassos. Cd. Obregón, Son. México.

Phelps R.A., Shenstone F.S., Kemmerer R.J., Evans, R.J. 1965. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. Poult. Sci. 44. 358-394. # M-207994-01-1.

Ridley, S.M. and McNally, S.F. 1985. Effects of phosphinothricin on the isoenzymes of glutamine synthetase isolated from plant species which exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide. Plant Science, 39, 31-36. #C002159.

Rosales, R. E. Y Sánchez de la C. R. 2005. Control post-emergente de maleza en variedades de algodonero tolerantes a glufosinato de amonio. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. Cd Victoria, Tamaulipas, México. (En anexo en letra I).

Rouquié, D. 2007a. Cry1Ab protein - In vitro digestibility in simulated intestinal fluid. Study number SA 07111. Bayer CropScience. December 05, 2007. 54 pages. DART number: M-295264-01-1.

Rouquié, D. 2007b. Cry1Ab protein - In vitro digestibility in simulated gastric fluid. Study number SA 07110. Bayer CropScience. December 05, 2007. 56 pages. DART number: M-295272-01-1.

Rouquié, D. 2008a. Cry2Ae protein - In vitro digestibility in simulated gastric fluid. Study number SA 08126. Bayer CropScience. October 09, 2008. 55 pages. DART number: M-308906-01-1.

Rouquié, D. 2008b. Cry2Ae protein - In vitro digestibility in simulated intestinal fluid. Study number SA 08127. Bayer CropScience. October 09, 2008. 52 pages. DART number: M-308911-01-1.

Roush, R.T. 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: Can transgenic crops be better than sprays? Biocontrol Sci. Technol. 4: 501-516.

Sadaaki Mase. 1984. Meiji Herbiace : common name bialaphos : a new herbicide. Japan pesticide information, number 45, 27-30. #A50614

Sanfacon, H., P. Brodmann, and T. Hohn. 1991. A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. Genes Dev. 5:141- 149.

Sankula S. 2006. Quantification of the impacts on US agriculture of biotechnology-derived crops planted in 2005. National Center for Food and Agricultural Policy. Washington, DC 20036. www.ncfap.org

Sauer, H., Wild, A. and Rühle, W. 1987. The effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis : II. The causes of inhibition of photosynthesis. Bioscience, 42c, 270-278. # A40320.

Steinrücken H.C., Amrhein N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 94(4): 1207-1212.

Tabashnik BE. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39: 47-79.

Tabashnik BE, Patin AL, Dennehy TJ, Liu YB, Carrière Y, Sims MA, Antilla L. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Procedings of the National Academy of Science USA* 97: 12, 980-12, 984.

Technical information. 2004. Glufosinate-ammonium. Bayer CropScience. Germany.38 p.

Thompson, C.J., Movva Rao, N., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal, 6(9), 2519-2523. # A40266

University of California. 1984. Integrated Pest Management for Cotton in the Western Region of the United States. Division of Agriculture and Natural resources. Publication 3305. USA. 144 p.

Van Deynze, A. E., Sundstorm, F.J., and Bradford, K.J. 2005. Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity. Crop Sci. 45:1565–1570.

Van der Klis R.J., Hendrickx K., Hérouet-Guicheney C., Rouan D. 2006. The double mutant 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase gene product: 2mEPSPS. Description and characterization. Bayer CropScience. Internal report. 59 pages. M-277049-01-1

Verdaguer, B., de Kochko, A., Beachy, R.N., and Fauquet, C. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. Plant Mol. Biol. 31: 1129–1139.

Verhaeghe, S. and Habex, V. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119. Bayer CropScience. Internal report. 41 pages. # BBS08-001.

Verhaeghe, S. and Criel, I. 2008. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments. Bayer CropScience. Internal report. 25 pages. # BIO2-005.

Walsh CT, Benson TE, Kim DH, Lees WJ. 1996. The versatility of phosphoenolpyruvate and its vinyl ether products in biosynthesis. Chemistry & Biology. 3: 83-91.

Wedler, F.C. and Horn, B.R. 1976. Catalytic mechanism of glutamine synthetase enzymes. J. Biol. Chem., 251:7530-7538.

Wendler, C. and Wild, A. 1990. Effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis and photorespiration. Z. Bioscience, 45c, 535-537. # C013885

Wild, A. and Manderscheid, R. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Bioscience, 39c, 500-504. # C013886

Wild, A., Sauer, H. and Rühle, W. 1987. The effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis: I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. Bioscience, 42c, 263-269. # A40321

Zambryski, P. 1988. Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. Ann. Rev. Genet. 22:1-30. #C034163

ANEXO I. MOVILIZACIÓN Y/O IMPORTACIÓN

1) Descripción del envase o empaque que se usará para movilizar el producto

Las semillas de algodón genéticamente modificado serán transportadas en bolsas de papel resistentes a la manipulación, selladas para prevenir cualquier derrame desde el origen hasta las bodegas y/o sitios autorizados para la liberación al ambiente. Esta semilla de algodón no será acompañada por ningún otro tipo de material biológico.

2) Cantidad del OGM a movilizar y el calendario propuesto de movilización y/o importación

Se importará 850 Kg. de semilla de algodón GLT a partir del 01 de diciembre de 2014 con el propósito de tener la semilla lista para el inicio de la siembra a partir del 15 de diciembre de 2014 en la región algodonera del Valle de Mexicali y posteriormente en el estado de Sonora.

3) La ruta de movilización del OGM, debe incluir el lugar de origen, destinos intermedios, sitios de almacenamiento, si es el caso; y destinos finales.

La ruta de movilización, será por tierra a partir del origen de la semilla en Mississippi y/o Texas, en los Estados Unidos de América**.** Posteriormente entrará a México a través de la aduana en Ciudad Juárez, Chihuahua o Nuevo Laredo, Tamaulipas; en caso necesario y sólo para hacer más eficiente la introducción a México, se buscaría otra aduana, como Matamoros, Reynosa o Mexicali o bien el Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México.

De la aduana se transportará por carretera directamente al lugar en donde se almacenará la semilla en la bodega de Bayer ubicada en: Bayer de México, S.A. de C.V. Km. 3 Carretera Panamericana Sur. Ciudad. Delicias, Chihuahua, donde se encuentra ubicada la oficina local de Bayer de México S.A. de C.V.; y de donde, será entonces entregada a los investigadores y agricultores cooperantes.

4) Descripción del procedimiento y medidas de bioseguridad a ser utilizadas para prevenir el escape y diseminación del producto manipulado durante su movilización.

El material GM será transportado en forma de semilla empacada en bolsas de papel cartón. Como medida preventiva, se realizará la limpieza y la eliminación de residuos vegetales de todos los vehículos e instalaciones donde se movilice o tenga contacto la semilla.

En la aduana de entrada al país, el algodón genéticamente modificado será recibido, por el Agente Aduanal de Bayer de México, cuya dirección y contacto es:

Lic. Elizabeth Rincón
C & E Agentes Aduanales, S.A. de C.V.
Paseo Triunfo de la Republica 2416-9
Col. Partido Escobedo
Cd. Juárez, Chihuahua
Tel. 656 613 8300

A partir de la llegada del material al agente aduanal, el material pasa a ser responsabilidad del país destino. Solo personal de Bayer o autorizado por la compañía puede retirar las semillas de la aduana luego de la liberación.

Previo traslado del material, el responsable constatará que no se hayan producido pérdidas accidentales durante el proceso de descarga y liberación.

El manejo, la forma de transporte y el empaque en que se movilizará el algodón genéticamente modificado están diseñados para minimizar la posibilidad de accidentes, sin embargo, en el caso que hubieran ocurrido derrames el personal de la empresa informará inmediatamente al responsable de asuntos regulatorios o al responsable de producción de la empresa. La empresa transportadora tendrá indicaciones para que se recoja la semilla derramada y mantengan el material bajo resguardo hasta que la empresa Bayer de México sea notificada. Se harán todos los esfuerzos por recuperar el material liberado y destruirlo inmediatamente. Se identificará el sitio del accidente y se establecerá un programa de monitoreo por un período de un año para identificar la presencia de plántulas y proceder a su destrucción inmediata por métodos mecánico o químico (herbicidas).

Se notificará a la autoridad competente por teléfono de manera inmediata y por escrito en el día hábil inmediato siguiente a la liberación accidental. Se documentará exhaustivamente todas las acciones anteriores incluyendo la hora y la fecha de cada acción.

5) Calendario de actividades

ACTIVIDAD	**D**	**E**	**F**	**M**	**A**	**M**	**J**	**J**	**A**	**S**	**O**
Siembra	x										
Conducción	x	x	x	x	x	x	x				
Toma de datos	x	x	x	x	x	x	x				
Cosecha							x	x			
Análisis de la información								x			
Informe final									x		

Índice de figuras

Figura	Descripción	Pág.
1	Mapa de distribución generado por la consulta a Fryxell (1979) y colección del Herbario Nacional “MEXU” (1998), del Instituto de Biología de la UNAM.	9
2	Mapa de distribución generado por la consulta al REMIB en la página de la CONABIO (2006).	10
3	Dibujo esquemático de la región del ADN-T en Gossypium hirsutum evento T304-40.	19
4	Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis Southern Blot del evento T304-40.	20
5	Dibujo esquemático de la región del ADN-T en Gossypium hirsutum evento GHB119.	21
6	Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis Southern Blot del evento GHB119.	22
7	Dibujo esquemático de la región del ADN-T en Gossypium hirsutum evento GlyTol® mostrando a estrategia de hibridación.	24
8	Resultados del análisis Southern Blot del algodón GlyTol® (T-DNA probe).	25
9	Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto 2mepsps ADN-T	28
10	Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto cry1Ab-bar ADN-T	28
11	Demostración de la estabilidad de GLT para la sonda del gene cry1Ab	29
12	Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto cry1Ab-bar ADN-T	29
13	Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008	30
14	Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008	32
15	Representación esquemática de la estructura del plásmido pTEM2	34
16	Polígono seleccionado donde se liberará el algodón GLT en la regiones agrícolas de Mexicali y San Luis Rio Colorado, Sonora.	53
17	Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a los herbicidas en los países que han adoptado esta tecnología de 1996-2006.	86

Índice de tablas

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Distribución de especies de *Gossypium* en México.	6
2	Contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™.	23
3	Niveles de la proteína 2mEPSPS en tejidos de la planta del algodón GlyTol®.	26
4	Elementos genéticos del vector pTDL008 que fueron insertados en el genoma de la planta.	31
5	Elementos genéticos del vector pTEM12 que fueron insertados en el genoma de la planta.	32
6	Análisis de segregación de los eventos independientes en el algodón TwinLink™.	33
7	Elementos genéticos del vector pTEM2 que fueron insertados en el genoma de la planta.	34
8	Análisis de segregación del Evento de Transformación GlyTol®.	35
9	Cantidades de proteína PAT en subproductos procesados del algodón Evento LLCotton25® por ELISA y expresado como porcentaje de Proteína Cruda.	42
10	Contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™. El contenido de las proteínas es expresado en µg/g peso fresco.	57
11	Niveles de la proteína 2mEPSPS en tejidos de la planta del algodón GlyTol®.	58
12	Hábito de crecimiento y morfología de la planta en varias regiones de los EE UU. Comportamiento del algodón TwinLink™ y la variedad Coker, con aplicación y sin la aplicación del herbicida glufosinato de amonio (GA).	59
13	Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2004.	60
14	Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2005.	60
15	Estado de autorizaciones de los eventos parentales del algodón GlyTol® x Twin Link™.	68
16	Estatus Regulatorio del algodón TwinLink™ en otros países.	68
17	Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en (CICOPLAFEST, 1998; SAGAR, 2000; PLM, 2006) algodonero.	74
18	Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados.	80
19	Consumo de combustible por el uso del tractor, por método de labranza.	87
20	Impacto de cambios en el uso de herbicidas e insecticidas por la cultivación global de los cultivos GM de 1996 a 2006.	87