



Bayer CropScience

**SOLICITUD DE PERMISO PARA LA LIBERACIÓN AL AMBIENTE
DEL ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO
BOLLGARD II®/SOLUCIÓN FAENA FLEX®
(MON-15985-7 x MON-88913-8)
EN ETAPA EXPERIMENTAL
EN EL ESTADO DE CHIHUAHUA,
DURANTE EL CICLO AGRICOLA P-V 2012**



1. Nombre, denominación o razón social de quien promueve

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

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

Ing. Bitia Osorio Trejo
Tel. 5728 3000 Ext 2786
Tel cel: 55 41922296

Email: bitia.osorio@bayer.com

Dr. Luis Arciga Reyes
Tel. 5728 3000 Ext 2726
Tel cel: 5512954096

E-Mail: luis.arciga@bayer.com

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

• Jonathan Holloway Ph.D. Field Trait Development Manager
Tel.: +1 806 765 8844

E-Mail: jonathan.holloway@bayer.com

• 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**

Dr. Luis Arciga Reyes –Gerente de Negocio BioScience

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

Formación Académica

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

Experiencia Profesional

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

IBQ. Bitia Osorio Trejo – Regulación en Biotecnología

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

Formación Académica

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

Experiencia Profesional

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



Ing. Abraham Sandoval Rodríguez – Desarrollo de productos para BioScience

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.
- Encargado del Sistema de Información Geográfica de las liberaciones de Algodón Genéticamente Modificado al ambiente.
- Promoción y mercadeo de productos.

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

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

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

Enlace de Epidemiología Cuarentenaria

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



I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM

(Referirse al paquete regulatorio del evento genético combinado Bollgard II®/Solución Faena Flex® (MON 15985 x MON 88913) en algodón propiedad de la Compañía Monsanto, se anexa carta).

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

El evento de transformación BOLLGARD II®/SOLUCIÓN FAENA FLEX® , identificador OECD número **MON-15985-7 x MON-88913-8**, denominado por simplicidad en lo sucesivo **BG2F**. El algodón BG2F porta los genes *cp4 epsps* (dos copias), *Cry1Ac* y *Cry2Ab*, los cuales le confieren resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a la aplicación del herbicida Glifosato.

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

Se llevó a cabo 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 figura que se presentan a continuación:

**Cuadro1. Distribución de especies de *Gossypium* en México (ver mapa en el anexo)**

Especie	Ubicación
Estado: Localidades y/o Municipios	
<i>G. aridum</i>	<p>Oaxaca: Tehuantepec, Guiengola, SE de la Ventosa hacia Niltepec, Sante María Huatulco y Juchitán.</p> <p>Guerrero: Acapulco, SE de San Luis, San Pedro y La unión.</p> <p>Michoacán: Villa Victoria, Huacana, Arteaga y cerca de la presa El Infiernillo.</p> <p>Colima: Ixtlahuacan y Tecomán.</p> <p>Jalisco: Chamela, Autlán, Hostotipaquillo, Tomatlán, La Huerta y Barra de Navidad.</p> <p>Nayarit: Nayar, Jesús María, ribera del Río Santiago, Tepic, Pochichitlan y Agua Milpa.</p> <p>Sinaloa: Mocorito, El Caimanero, Rancho Viejo, Cofradia y Culiacán.</p> <p>Veracruz: Actopan.</p> <p>Puebla: Tecamatlán, Jolalpan, San Pedro de las Palmas, Tecuautitlán San Martín.</p>
<i>G. armourianum</i>	Baja California: Golfo de California e Isla San Marcos.
<i>G. davidsonii</i>	<p>Baja California: Arroyo Salado, ribera del Río La Purísima, Sierra de la Giganta, Los Cabos, Santa Anita y La Paz.</p> <p>Sonora: Guaymas.</p>
<i>G. gossypoides</i>	Oaxaca: Santa Ana, Xishilo Cuicallán, San Bartolo Yautepec, Tlacolula y Tehuantepec.
<i>G. harknessii</i>	Baja California: Cieneguita, Isla Margarita, Isla Montserrat, Loreto, La Paz, Isla Coronado, Isla del Carmen y Agua Grande.
<i>G. hirsutum</i>	<p>Baja California: La Paz e Isla Socorro.</p> <p>Campeche: Xpujil, Champotón, Palizada, Constitución y Campeche.</p> <p>Chiapas: Acala, San Nicolas, Palenque y Ocosingo.</p> <p>Guerrero: Acapulco y Río Barbulillas, Zihuatanejo.</p> <p>Jalisco: San Martín de Bolaños, San Martín Hidalgo, La Huerta, Autlán y Malaque.</p>



	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.
<i>G. lanceolatum</i>	Baja California: Isla Socorro.
	Guerrero: Acapulco, José Azueta, Coyuca de Benítez, Coyuca de Catalán y Zihuatanejo.
	Colima: El Huerto e Isla Socorro.
<i>G. laxum</i>	Guerrero: Chilpancingo, Zumpango del Río y al oeste de Milpillas.
<i>G. lobatum</i>	Colima: Coquimatlán.
	Guerrero: Acapulco.
<i>G. thurberi</i>	Chihuahua: Madera y El Lago
	Sonora: Río Bavispe y Hasabas, Horconcitos, Benjamin Hill, Magdalena, Yecora e Himuris.
<i>G. trilobum</i>	Jalisco: Oblatos al norte de Guadalajara.
	México: Polotitlán y Valle de Bravo.
	Michoacán: Benito Juárez.
	Morelos: Yautepec y Cuernavaca.
	Oaxaca: Chiquihuitlán de Benito Juárez.
<i>G. turneri</i>	Sonora: Guaymas y Bahía San Pedro al sur de Hermosillo
<i>G. barbadense</i>	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 las regiones algodoneras del estado de Chihuahua, y mucho menos aún en las áreas dedicadas al cultivo del algodón donde se encuentran incluidas las áreas donde se pretende sembrar el algodón BG2F resistente al ataque de insectos lepidópteros y tolerante al herbicida glifosato.

De acuerdo con la comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) cerca del polígono donde se pretende hacer la liberación al ambiente del algodón B2SF se encuentran las siguientes áreas naturales protegidas: El Pinacate y Gran Desierto de Altar; Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado; Sierra de Ajos / Bavispe; Islas del Golfo de California; Bahía de los Ángeles y Salsipuedes y Valle de los Cirios.

Existe, sin embargo, el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V. de no liberar el algodón B2F a una distancia menor a un kilómetro de cualquier ANP o cuerpo de agua.

Además, Niles y Feaster (1984), en Kohel y Lewis, (1984) mencionan que el polen del algodón es pesado y el transporte del mismo por el viento prácticamente es nulo; por lo tanto, la transferencia del polen solo puede darse por medio de los insectos y en este sentido, se ha encontrado que muy poco polen es transferido ya a los 12 metros de la fuente (Kareiva *et al.*, 1994); distancia mucho muy inferior a la que se encuentran las Áreas Naturales Protegidas ya mencionadas, en la que además no se reportan especies sexualmente compatibles con *G. hirsutum*.



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 BG2F 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.



El nuevo rasgo, la resistencia al ataque de insectos lepidópteros y la tolerancia al herbicida glifosato, es la única diferencia con respecto al algodón convencional; por tanto la planta de algodónero BG2F 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 influyen el clima durante el desarrollo de este cultivo.

Siendo el algodónero una planta tropical, es altamente sensible a temperaturas por debajo de los 10° C, y produce poco o nulo crecimiento a temperaturas por debajo de los 15.6° C. La temperatura óptima para el crecimiento de brotes del algodón es aproximadamente 30° C; para crecimiento de raíces la temperatura óptima del suelo es entre 29.4° C y 35° 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: *hirsutum* (2n=52, Upland cotton)

Cultivar: Varias variedades y líneas de mejoramiento

Nombre común: Algodón

Organismo donador

El algodón BG2F es producto del cruzamiento convencional de los eventos Bollgard II (**BG2**) con resistencia al ataque de insectos lepidópteros y Solución Faena Flex (**F**). A continuación se describen los organismos donadores de los genes principales que se integraron en cada evento de transformación.

⇒ Para el evento BG2

Los genes *Cry1Ac* y *Cry2Ab* fueron aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram-positivo que habita de manera natural en el suelo y ha sido utilizada comercialmente durante casi 40 años para el control de



insectos. Produce una proteína (endotoxina) que actúa específicamente sobre las larvas de insectos lepidópteros al destruir su sistema digestivo.

Bacillus thuringiensis

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

⇒ **Para el evento F**

El gen cp4 *epsps* fue aislado de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* raza CP4. *A. tumefaciens* es una bacteria común del suelo que causa la enfermedad de agallas de la corona en plantas susceptibles. No ha habido reportes de efectos adversos en el hombre y los animales.

Agrobacterium tumefaciens

Especie: *Agrobacterium tumefaciens*
Género: *Agrobacterium*
Familia: Rhizobiaceae
Orden: Rhizobiales
Clase: Alpha Proteobacteria
Nombre común: *Agrobacterium*

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

El algodón BG2F fue producido por Monsanto Company en St. Louis Missouri, USA. Bayer CropScience USA ha incorporado la tecnología BG2F a sus variedades.

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 Hawaii. 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 anfidiplóide (**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 cultivadas 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: | <i>G. australe, G. sturtii, G. robinsonii</i> |
| 2. Sección II. | Erioxyla: | <i>G. aridum, G. armourianum, G. lobatum, G. harknessii</i> |
| 3. Sección III. | Klotzchiana: | <i>G. klotzchianum, G. Klotzchianum var davidsonii, G. raimondii</i> |
| 4. Sección IV. | Thurberana: | <i>G. thurberi, G. gossypioides</i> |
| 5. Sección V. | Anomala: | <i>G. triphyllum, G. anomalum</i> |
| 6. Sección VI. | Stoksiana: | <i>G. stocksii, G. longicalyx, G. somalense, G. incanum, G. areisiasum.</i> |

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 Hawaii.

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: *Mariegalante*, *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 Hawaii).

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 inserción;

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, le fueron transferidos los siguientes genes y elementos reguladores.

a) Tecnología Bollgard II® (MON15985-7)

Elementos genéticos presentes en el vector PV-GHBK04 utilizado en la obtención de algodón Bollgard®. La construcción de este vector de un solo borde (derecho) integra dos genes (incluyendo el marcador selectivo NPTII y es introducido al organismo donador mediante el sistema ABI.

Cuadro 2. Resumen de los elementos genéticos del plásmido PV-GHBK04 utilizado para la obtención del algodón Bollgard®

ELEMENTO GENÉTICO	TAMAÑO (Kb)	ORIGEN/FUNCIÓN
Cassette de expresión del gen modificado <i>cry1Ac</i>		
P-E35S	0.62	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciada duplicada usando para dirigir la expresión de la región codificante del gen <i>cry1AC</i> (Kay <i>et al.</i> , 1987).
Cry 1Ac	3.5	Gen de <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. Kurstaki que codifica una variante sintética para la proteína <i>Cry1Ac</i> que confiere resistencia a insectos lepidópteros en plantas. (Adang <i>et al.</i> , 1985).
7S 3'	0.43	Región 3' no traducida de la subunidad alfa del gen de la β -conglucina de la soya (<i>Glycine max</i> L.), el cual controla la terminación transcripcional y dirige la poliadenilación del mRNA del gen <i>cry1Ac</i> (Schuler <i>et al.</i> , 1992).
Cassette de expresión del gen <i>nptII</i>		
P-E35S	0.62	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciada duplicada usando para dirigir la expresión de la región codificante del gen <i>cry1AC</i> (Kay <i>et al.</i> , 1987).
nptII	0.75	Gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II derivado del transposón Tn5 de <i>Escherichia coli</i> . La expresión de este gen en plantas confiere resistencia al antibiótico kanamicina y sirve como marcador de selección (Beck <i>et al.</i> , 1982; Fraley <i>et al.</i> , 1983).
NOS 3'	0.26	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i> el cual controla la terminación de la transcripción y dirige la poliadenilación del mRNA del gen nptII (Fraley <i>et al.</i> ,



1983; Depicker *et al.*, 1982; Baven *et al.*, 1983).

Otros componentes

Borde derecho (RB)	0.09	Secuencia de DNA derivada del plásmido pTiT37 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia de 24 pb del borde derecho (RB) que inicia el evento de transferencia del T-DNA de <i>Agrobacterium</i> a la planta. (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983).
aad	0.79	Promotor bacteriano y secuencia codificante para la enzima 3' (9) nucleotidiltransferasa derivada del transposón Tn7 que confiere resistencia bacteriana a los antibióticos espectinomicina y estreptomomicina (Fling <i>et al.</i> , 1985).
Ori-V	0.62	Origen de replicación para <i>A. tumefaciens</i> derivado de un amplio rango de hospedantes RK2 (Stalker., 1981).
Ori-322/rop	1.8	Origen de replicación derivado del plásmido pBR322 para replicación del plásmido PV-GHBK04 en <i>E. coli</i> . (Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Sutcliffe, 1978).

Elementos genéticos presentes en el PV-GHBK11 utilizado en la obtención del algodón genéticamente modificado Bollgard®II para la introducción del gen *Cry2Ab* en plantas de algodón Bollgard® portadoras del gen *cry1Ac*.

Cuadro 3. Descripción de los elementos genéticos contenidos en el plásmido vector PV-GHBK11

ELEMENTO GENÉTICO	TAMAÑO (Kb)	ORIGEN/FUNCIÓN
Cassette de expresión del gen <i>uidA</i>		
P-e35S	183-797	Promotor 35S del CaMV (virus del mosaico de la coliflor) (Odell <i>et al.</i> , 1985) con la región potenciadora duplicada usando para dirigir la expresión del gen <i>uidA</i> .
Secuencias intermedias	798-828	Secuencia sintética (sitio de clonación múltiple).
<i>uidA</i>	829-2637	Gen del plasmido de pUC19 de <i>Escherichia coli</i> que codifica la proteína β-D-glucuronidasa (GUS) usado como marcador visual para identificar plantas transformadas (Gilissen <i>et al.</i> , 1998).
Secuencias intervénientes	2638-2692	Región sintética (sitio de unión).
NOS 3'	2693-2948	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , el cual termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
Secuencias intervénientes	2949-3013	Secuencia sintética (sitio de unión).
Cassette de expresión del gen modificado <i>cry2Ab</i>		



P-e35S	3014-3627	Promotor 35S del CaMV virus del mosaico de la coliflor (Odell <i>et al.</i> , 1985) con la región potenciadora duplicada usando para dirigir la expresión del gen <i>cry2Ab</i> .
PetHSp70-leader	3628-3727	Secuencia líder 5' no traducida del gen de la proteína de choque térmico HSP70 de petunia.
AEPSPS/CTP2	3729-3959	Secuencia N-terminal del péptido de transferencia al cloroplasto del gen <i>epsps</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Van den Broeck, <i>et al.</i> , 1985).
<i>Cry2Ab</i>	3966-5873	Gen sintético <i>cry2Ab</i> basado en la secuencia del gen de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Widner and Whiteley, 1990).
Secuencias intermedias	5874-5896	Secuencia sintética (sitio de unión).
NOS 3'	5897-6152	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , el cual termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
Otros componentes		
Secuencias intermedias	6153-6277	Secuencia sintética (sitio de unión).
Esqueleto del plásmido	6278-158	(Vieira and Messing, 1987).
lacZ	6278-6516	Secuencia codificadora parcial lacI, el promotor P-lac y la secuencia codificadora parcial para β -D-galactosidasa o la proteína <i>lacZ</i> .
Ori-pUC	6661-7315	Origen de replicación del plásmido que permite la replicación del DNA en una bacteria hospedante como <i>E. coli</i>
nptII (kan)	7396-8363	Gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II de Tn5, un transposón aislado de <i>Escherichia coli</i> (Beck <i>et al.</i> , 1982). El gen nptII también contiene una porción de =.153 kb del gen <i>ble</i> de 0.378 kb del transposón Tn5.
p-kan	8452-8501	Promotor del gen nptII obtenido del transposón Tn5
Secuencias intermedias	159-182	Secuencia sintética (sitio de unión).

b) Tecnología Solución Faena Flex® (MON-88913-8)

Elementos genéticos presentes en el vector PV-GHGT35 utilizado en la obtención del algodón genéticamente modificado solución Faena Flex®

Cuadro 4. Resumen de los elementos genéticos contenidos en el plásmido PV-GHGT35

Elemento genético	Función
Cassette de expresión del gen modificado <i>cp4 epsps</i> regulado por P-FMVTSF1	
P-FMV/TSF1	Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen TSF1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus



	del mosaico de la <i>Scrophularia</i> (FMV).
L-TSF1	Secuencia líder (exón 1) del gen TSF1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica el factor de elongación EF-1alfa
I-TSF1	Intron del gen TSF1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica al factor de elongación EF-1 alfa.
TS-ctp2	DNA derivado de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Péptido de transito al cloroplasto aislado del EPSPS de <i>Arabidopsis thaliana</i> , empleado para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, el sitio de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.
CR-cp4 epsps	Secuencia codificante para la 5-enol-pyruvil-shikimato-3-fosfato sintasa derivada de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa CP4.
T-E9	Secuencia de DNA derivada de <i>Pisum sativum</i> conteniendo la región 3' no traducida del gen rbc E9 codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa1, bifosfato carboxilasa de chícharo.
Cassette de expresión del gen modificado cp4 epsps regulado por P-35SACT8	
P-35S/ACT8	Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen ACT8 de <i>Arabidopsis thaliana</i> combinado con secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus del Mosaico de la coliflor.
L-ACT8	Secuencia líder del gen ACT8 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
I-ACT8	Intron y secuencia del exón flanqueante del gen ACT8 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
TS-ctp2	Secuencia de DNA derivado de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Péptido de transito al cloroplasto aislado de la EPSPS al cloroplasto, el sitio de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.
CR-cp4 epsps	Secuencia de DNA codificante para la proteína CP4 EPSPS de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa CP4.
T-E9	Secuencia de DNA derivada de <i>Pisum stivum</i> conteniendo la región 3' no traducida del gen rbc E9, codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa de chícharo.

El número total de pares de bases del PV-GHGT35 usados para crear MON 88913 es de 13,741 pb. Los elementos que componen el vector se detallan en el cuadro 4. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos se muestra en inciso m) y p). Análisis Southern Blot de DNA genómico de MON 988913 muestran la inserción única del T-DNA del plasmado PV-GHGT35 en un solo locus. Los análisis revelan la inserción de dos copias del cassette de expresión CP4 EPSPS, que incluye las secuencias del promotor, potenciador, terminador y péptido de transito (ctp2) <http://www.agbios.com> y Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for MON15985 x MON88913.



El número total de pares de bases del PV-GHBK11 usados para crear MON 15985 es de 8,718 pb. Los elementos que componen el vector se detallan en el cuadro 3. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos se muestra en inciso m) y p). Análisis Southern Blot de DNA genómico de MON 15985 muestran la integración de una sola copia en un solo sitio del cassette de expresión de los genes de *cry2Ab* y *uidA*. Este cassette contiene las regiones codificantes para cada gen, aun cuando el sitio de restricción siguiente a la secuencia de poliadenilación de NOS 3' y la secuencia de 260 pb de la región 5' del promotor 35S CaMV para la expresión del gen *uidA* no esta presente. El promotor *uidA* de mantuvo funcional a pesar del truncamiento.

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. (Referirse al paquete regulatorio del evento genético combinado Bollgard II®/Solución Faena Flex® (MON 15985 x MON 88913) en algodón, propiedad de la Compañía Monsanto, se anexa carta).

a) Caracterización molecular del algodón Bollgard®.

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

El segundo inserto de ADN-T contiene una porción de 242 pares de bases de la secuencia de poliadenilación 7S 3' de la región terminal del gen *cry1Ac*. No se detectó transcrito de RNA



por transcripción inversa RT-PCR, que se correspondiera o hubiera sido transcrito del inserto de ADN-T de 242 pares de bases 5' 3', por lo tanto no se produce ningún péptido, según lo esperado.

Los datos individuales de cruzamientos con otras variedades comerciales de algodón demuestran la estabilidad de la transferencia del inserto funcional, de generación en generación. Basándose en análisis moleculares, datos sobre la expresión fenotípica y patrones de herencia, se ha demostrado la integración estable del gen *cry1Ac* dentro del cromosoma del algodón Bollgard®. Los resultados de dichos estudios se resumen a continuación:

- Análisis por Southern (Southern, 1975) blot de numerosas generaciones de algodón Bollgard®, llevados a cabo durante ocho años, han dado como resultado un patrón de Southern blot idéntico, lo que indica la estabilidad del inserto funcional del gen *cry1Ac*.
- Análisis ELISA de semilla obtenida de ensayos en múltiples localidades, durante ocho años, mostraron niveles similares de las proteínas Cry1Ac y NPTII.
- Se ha confirmado la producción de la proteína Cry1Ac por detección inmunológica y/o datos de eficacia bajo diferentes condiciones ambientales, en numerosas variedades de algodón Bollgard®.
- Se observa herencia mendeliana de la característica Bollgard® después de auto-polinización o retrocruzamientos con otras variedades de algodón.
- La eficacia insecticida se ha mantenido durante el desarrollo de este producto, desde su comercialización en 1996.
- La calidad de la semilla del algodón Bollgard® se ha mantenido después de la transferencia del gen *cry1Ac* dentro de distintas variedades comerciales.

De acuerdo con estos resultados, no existe evidencia o probabilidad de inestabilidad genética o de ineficacia. Además, estos datos confirman que la característica Bollgard® está integrada establemente en el genoma del algodón.

b) Caracterización molecular del algodón Bollgard®II.

El algodón Bollgard®II evento 15985 contiene dos genes que codifican para las proteínas insecticidas, *cry1Ac* y *cry2Ab*, ambos provenientes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Estos genes codifican proteínas tóxicas a insectos lepidópteros plaga del algodón. El algodón Bollgard II® también contiene los genes *npt II* (marcador de resistencia a kanamicina), *aad* (resistencia a estreptomycin y espectinomycin) y *uidA* (reportero). El gen *aad* no se expresa en plantas debido a que no cuenta con el promotor necesario; este gen fue utilizado como marcador de selección en laboratorio antes de la transformación vegetal como selector para bacterias que contenían la construcción de DNA. El gen *uidA* proviene de la bacteria *Escherichia coli* cepa K12 y codifica la enzima b-glucuronidasa (GUS).

El algodón evento 15985 resistente al ataque de insectos plagas del orden lepidóptera fue desarrollado por el método biobalística empleando el fragmento *KpnI* del plásmido PV-GHBK11 que contiene los casetes de expresión de *cry2Ab* y *uidA*. El evento 15985 no contiene secuencias detectables del esqueleto del plásmido como producto de la transformación. El mapa de restricción del inserto se ilustra a continuación.

c) Caracterización molecular del algodón Solución Faena Flex®.

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

d) Caracterización molecular del algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8)



de manera independiente, por lo tanto, expresa las proteínas provenientes de ambos eventos de transformación. Los estudios de caracterización molecular que confirman la presencia de los eventos MON 15985 y MON 88913 en el algodón MON 88913 × MON 15985 (Bollgard®II/Solución Faena Flex®) son propiedad de Monsanto comercial.

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 Bollgard®II/Solución Faena Flex® fue obtenido por cruzamiento convencional del algodón Bollgard®II (MON-15985-7) con el algodón Solución Faena Flex® (MON-88913-8).

a) Tecnología Bollgard® II (MON-15985-7).

El algodón Bollgard®II fue producido al insertar en el genoma del algodón Bollgard® variedad DP50B (que contiene los genes *cr1Ac* y *npt II*) el gen *cry2Ab*.

I. Bollgard® (MON-00531-6).

El organismo vector es la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* mediante el plásmido PV-GHBK04 (figura 3).

El sistema de transformación con *A. tumefaciens* es ampliamente conocido y ha sido utilizado durante muchos años en la modificación genética de diversas plantas dicotiledóneas. El plásmido vector fue modificado, de manera tal que el sistema de transformación no pudiera transmitir la enfermedad de la agalla de la corona. Este sistema de transformación integra genes del plásmido vector dentro del cromosoma de la célula de la planta de forma estable. La caracterización molecular demostró que se integraron dos insertos de ADN-T (ADN transferido) dentro del genoma del algodón para producir Bollgard®, evento 531. El gen *cry1Ac* segregó de manera consistente con la presencia de una sola copia activa de la región codificante y se transfirió de forma estable, por técnicas de mejora tradicionales, a numerosas variedades comerciales de algodón.

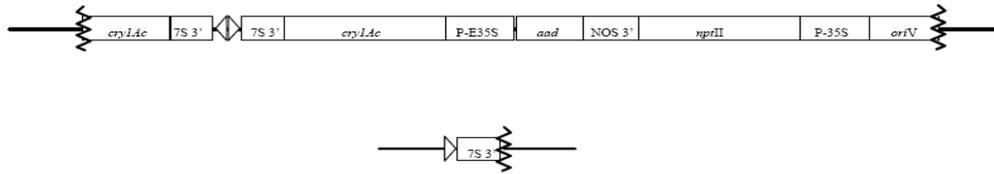


Figura 3. Mapa genético de los genes insertados en el evento MON 00531-6 de algodón resistente al ataque de insectos lepidópteros.

El plásmido vector utilizado dentro de *A. tumefaciens* para producir el algodón Bollgard®, evento 531, contiene la secuencia completa de los genes *cry1Ac*, *nptII* y *aad*. El gen *cry1Ac* deriva de la bacteria común del suelo *B. thuringiensis* variedad *kurstaki* (*B.t.k.*) y codifica la proteína insecticida, Cry1Ac. El cassette del gen *cry1Ac* contiene un promotor e-35S y una secuencia de terminación transcripcional 7S 3'. El gen *nptII* codifica una enzima marcadora de selección, neomicina fosfotransferasa II (NPTII), utilizada para identificar las células de algodón que contenían la proteína Cry1Ac. El gen *nptII* esta controlado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y está seguido por una región de nopalina sintasa (*nos*) 3' que dirige la poliadenilación del RNAm. La proteína NPTII no es útil para ningún otro propósito y carece de propiedades insecticidas. El gen *aad* codifica la enzima marcadora de selección bacteriana 3' (9)-O-aminoglicósido adenililtransferasa (AAD), que permitió la selección de *Agrobacterium*, en medio que contenía espectinomicina o estreptomycin. El gen *aad* esta bajo el control de un promotor bacteriano, y por lo tanto, la proteína codificada no se expresa en las plantas derivadas del algodón Bollgard®, evento 531.

Construcción del plásmido vector PV-GHBK04:

La construcción de este vector de un solo borde (derecho) integra dos genes (incluyendo el marcador selectivo NPT II) y es introducido al organismo donador mediante el sistema ABL. La descripción de los genes quiméricos se detalla bajo el siguiente orden: promotor, región codificadora y la 3' terminal no traducida.

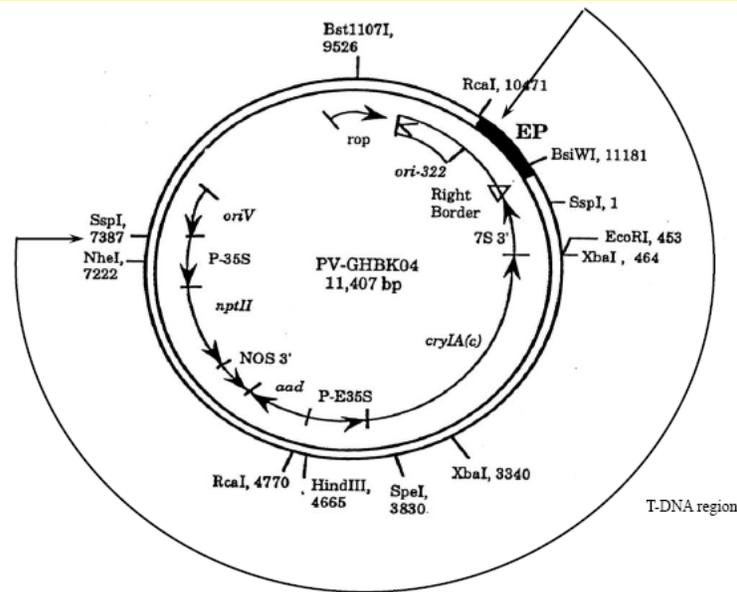


Figura 4. Mapa del plásmido PV-GHBK04 usado para crear el evento MON 00531-6 de algodón resistente a insectos lepidópteros.

- **PE35S** - Es el promotor de 0.6 kb 35S del virus mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.*, 1985) con la región potenciadora duplicada (Kay *et al.*, 1987).
- **Cry1Ac** - FL B.t.k.- Un gen de 3.6 kb que codifica la totalidad de la proteína de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*, esencialmente idéntica a la descrita por Adang *et al.*, 1985. La expresión de este gen en plantas les confiere resistencia a insectos lepidópteros.
- **7S 3'** – La región no traducible de 0.43 kb de la subunidad alfa del gen de la beta conglicina y proporciona la señal de poliadenilación en el mRNA (Schuler *et al.*, 1982).
- **aad** – El gen de 0.79 kb que codifica para 1.0-aminoglicósido adenilil transferasa que permite la selección de bacterias transformantes en espectinomicina o estreptomicina.
- **35S** - Región promotora 35S (0.35 kb) del virus mosaico de la coliflor (CaMV).
- **nptII** - Gen 0.83 kb neomicina fosfotransferasa tipo II que confiere resistencia a Kanamicina (Fraleley, *et al.*, 1983). La expresión de este gen en plantas sirve como un “marcador selectivo” para transformación.
- **NOS 3'** - La región 0.3 kb 3' no traducida del gen nopalina sintasa (Fraleley, *et al.*, 1983).

II. Bollgard® II (MON-15985-7).

El algodón Bollgard®II evento 15985 se obtuvo mediante transferencia de los genes *cry2Ab* y *uidA* al algodón GM Bollgard® variedad DP 50 B (que contenía los genes *cry1Ac*, *nptII* y *aad*). El algodón Bollgard® fue desarrollado empleando el sistema de *A. tumefaciens* con un vector desarmado.

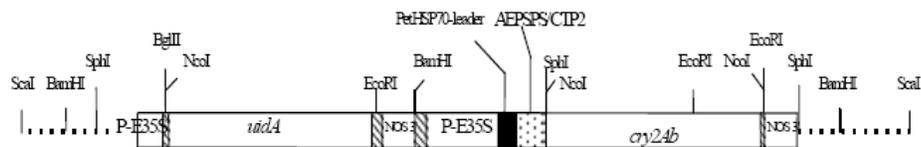


Figura x. Mapa genético de los genes insertados para crear el evento de algodón MON 15985-7 resistente a insectos lepidópteros

El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón Bollgard® DP 50 B (portadora del gen *cry1Ac*) fue el de “biobalística” (John *et al.* 1997) utilizando el plásmido B1579.

Los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* y las proteínas que codifican.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® combinan la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ac y Cry2Ab de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Las proteínas Cry (por “crystalline”; también denominadas proteínas Bt o toxinas Bt) pertenecen a una extensa familia de proteínas producidas por varias subespecies de *B. thuringiensis*. Los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* provienen de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.). Los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* codifican toxinas Bt altamente específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodón: 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) (Dankocsik *et al.* 1990; MacIntosh *et al.*, 1990; Widner & Whiteley, 1989).

El efecto tóxico de las proteínas Bt requiere de condiciones alcalinas (como las proporcionadas en el intestino de la larva del insecto) para que se disuelvan los cristales, digestión parcial por proteasas específicas para que liberen el núcleo activo de la toxina y la unión específica de ésta a receptores presentes en la superficie de las células epiteliales del intestino medio del insecto. La unión específica de la toxina a estos receptores conduce a la formación de poros en la membrana plasmática y a la eventual muerte celular, parálisis intestinal e inanición. Estos son los pasos que proporcionan el alto grado de especificidad para cada proteína Bt (English & Slatin 1992; Hofmann *et al.*, 1988; Knowles & Dow, 1993; Van Rie *et al.*, 1989).

La expresión de los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se encuentra controlada por el promotor mejorado 35S. La región terminadora para el mRNA del gen *cry1Ac* es proporcionada por la región 3' no traducida del gen de la subunidad alfa de la beta conglucina de soja y para el gen *cry2Ab* por la región 3' no traducida del gen *nos* de *A. tumefaciens*.

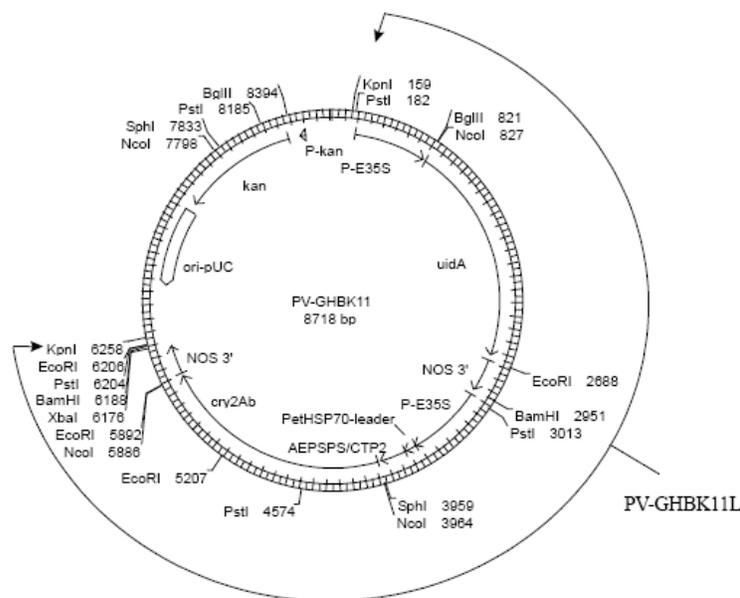


Figura 6. Mapa del plasmido PV-GHBK11 usado para crear el evento de algodón MON 15986-7 resistente al ataque de insectos lepidópteros

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. Al igual que la toxina Cry1Ac que expresan los algodones Bollgard®, la toxina Cry2Ab controla al gusano bellotero y rosado, sin embargo, estudios realizados por Monsanto han confirmado que existen diferencias en los mecanismos insecticidas de estas proteínas. Las pruebas realizadas *in vitro* e *in planta* indican que la combinación de ambas proteínas incrementa la actividad insecticida observada para cada proteína individual. Este incremento en la actividad insecticida sugiere que estas toxinas actúan de manera aditiva. Existen también diferencias entre las proteínas respecto a su nivel de actividad en las diferentes especies de plagas. La proteína Cry2Ab tiene mayor eficacia contra el gusano bellotero (*H. zea*) y cogollero (*S. frugiperda*) que Cry1Ac, pero esta última es más eficaz contra el gusano tabacalero (*H. virescens*) y rosado (*P. gossypiella*). Por lo anterior, las variedades de algodonoero Bollgard®II/Solución Faena Flex® que expresan las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un mejor espectro de control al que ejerce Bollgard® solamente y, por lo tanto, reducen el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo contra ambas toxinas.

El gen reportero *uidA* y la proteína codificada.

Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen el gen reportero *uidA*. Este gen fue empleado como marcador en el laboratorio para seleccionar satisfactoriamente las células de algodón modificado Bollgard®II durante el proceso de transformación. El gen *uidA* proviene de la bacteria *Escherichia coli* y codifica para la enzima beta glucuronidasa (GUS). La enzima GUS transforma un sustrato incoloro a un producto de color azul en un ensayo sencillo y es utilizada como un “marcador” reportero para detectar tejidos que han sido transformados satisfactoriamente. La exposición de tejidos vegetales que contienen la enzima GUS a este sustrato facilita la cuantificación de la expresión del gen *uidA* (Jefferson *et al.*, 1986).

Los genes de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* y las proteínas que codifican.

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contiene los genes marcadores de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* provenientes de *Escherichia coli*. Estos genes fueron empleados durante los pasos iniciales de trabajo de laboratorio para el desarrollo de las plantas de algodón Bollgard®II a fin de permitir la selección de células que contenían la modificación

genética deseada. Ambos genes se emplean comúnmente como marcadores de selección durante la obtención de plantas GM. El gen *nptII* fue aislado a partir del transposón Tn5 (Beck *et al.*, 1982) y codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPT II), que confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina y la neomicina. La enzima NPT II utiliza ATP para fosforilar kanamicina y neomicina, inactivando así los antibióticos y previniendo la muerte de las células que producen NPT II. El gen *npt II* funciona como un marcador de selección en los pasos iniciales de laboratorio donde se seleccionan las células de algodón que han sido modificadas genéticamente, permitiendo su desarrollo mientras que se inhibe el crecimiento de las células que no han sido transformadas. La enzima NPT II se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y en la cadena alimenticia; los microorganismos resistentes a kanamicina se presentan en forma natural en el suelo y en los sistemas digestivos de mamíferos (Flavell *et al.*, 1992). La expresión del gen *nptII* en las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® está controlado por el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y se utiliza como región terminadora del mRNA la del gen *nos* de *A. tumefaciens*.

El gen *aad* fue utilizado en el laboratorio, antes de la producción de las plantas genéticamente modificadas, para selección en bacterias que contenían el plásmido con la construcción a utilizar en la transformación del algodón. Este gen fue aislado del transposón Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina (Davies & Benveniste 1974). El gen *aad* no se expresa en las plantas de algodón debido a que se encuentra bajo el control de su promotor bacteriano, el cual no es activo en plantas y no se han adicionado los elementos genéticos necesarios para su expresión en plantas.

b) Tecnología Solución Faena Flex® (MON-88913-8).

El organismo vector es la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* mediante el plásmido PV-GHGT35 (figura 4). El sistema de transformación con *A. tumefaciens* es ampliamente conocido y ha sido utilizado durante muchos años en la modificación genética de diversas plantas dicotiledóneas. El plásmido vector fue modificado, de manera tal que el sistema de transformación no pudiera transmitir la enfermedad de la agalla de la corona. Este sistema de transformación integra genes del plásmido vector dentro del cromosoma de la célula de la planta de forma estable.

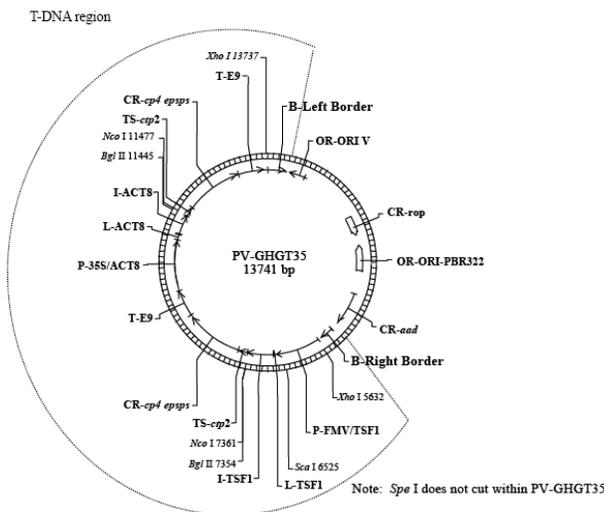


Figura 6. Mapa del plasmido PV-GHGT35 usado para crear el evento de algodón MON 88913-8 tolerante a glifosato

El gen *cp4 epsps* y la proteína que codifica.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen dos copias del gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. El gen *cp4 epsps* codifica una enzima (CP4 EPSPS) que es tolerante a la inhibición por el herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993), y se ha incorporado a las plantas de algodón para conferir tolerancia a las aplicaciones foliares de glifosato. La enzima EPSPS nativa del algodón es susceptible al herbicida glifosato.

En las plantas el gen *epsps* nativo (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) codifica para una enzima (EPSPS) crucial en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina), componentes esenciales de las proteínas. El herbicida glifosato actúa inhibiendo la actividad de la enzima EPSPS de las plantas, bloqueando la biosíntesis de aminoácidos aromáticos impidiendo así la sobrevivencia de las células vegetales (Steinrücken & Amrhein 1980). El gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* es insensible a los efectos del herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993) y es capaz de permitir el funcionamiento normal de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Consecuentemente, en las plantas genéticamente modificadas que contengan el gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* la biosíntesis de aminoácidos aromáticos no

es bloqueada por la presencia del herbicida glifosato y las plantas no mueren cuando se aplica sobre ellas este herbicida.

Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® difieren del algodón Solución Faena® que se comercializa actualmente, que contiene una sola copia del gen *cp4 epsps*, en que la tolerancia al herbicida glifosato es más prolongada. En el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® la aplicación de glifosato para el control de maleza se puede realizar durante el desarrollo del cultivo hasta siete días antes de la cosecha. Por el contrario, si en el algodón Solución Faena® el herbicida glifosato no es aplicado para controlar la maleza por alguna causa, por ejemplo lluvia, cuando la planta llega al estadio de 4ª hoja o 35 días de crecimiento, el herbicida ya no puede ser aplicado sobre el cultivo en estadios de desarrollo posteriores. Por lo tanto el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® tiene la intención de brindar a los agricultores mayor flexibilidad en cuanto a la época de aplicación del herbicida para el control de la maleza.

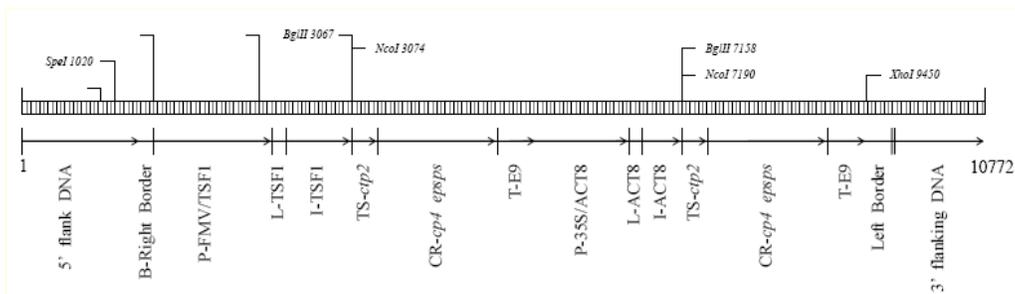


Figura 8. Mapa genético de los genes insertados en el evento de algodón MON 88913-8 tolerante a glifosato

La secuencia del gen *cp4 epsps* en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® ha sido modificada para obtener una expresión óptima en plantas (Padgett *et al.*, 1993). Aún cuando la secuencia se ha modificado, la enzima producida presenta la misma secuencia de amino ácidos que la enzima nativa de *Agrobacterium*. El gen *cp4 epsps* se encuentra unido a la región codificante (fusión traduccional) del péptido de tránsito a cloroplasto del gen *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al.*, 1987). El péptido de tránsito a cloroplasto permite ubicar a la enzima CP4 EPSPS en el organelo, sitio donde se lleva a cabo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. En las plantas la EPSPS es sintetizada como una pre-proteína (contiene el



péptido de tránsito) en ribosomas libres del citoplasma. El precursor es transportado hacia el estroma del cloroplasto y procesado proteolíticamente para que se obtenga la enzima “madura” (della-Cioppa *et al.*, 1986). Una vez “cortado” el péptido de tránsito se degrada rápidamente (Bartlett *et al.*, 1982; della-Cioppa *et al.*, 1986).

En el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se encuentran dos copias del gen *cp4 epsps* y cada copia se encuentra bajo el control de diferentes promotores. Una copia se encuentra bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) mientras que el otro se encuentra bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (FMV). Los promotores 35S dirigen la expresión de los genes *cp4 epsps* a todos los tejidos de la planta durante todo su desarrollo (expresión constitutiva). El algodón GM también presenta elementos promotores adicionales y secuencias no codificantes para mejorar la expresión génica, estos elementos adicionales se han obtenido de otras especies vegetales. La región 3' de las construcciones que permiten la expresión del mRNA de *cp4 epsps* también proviene de otras especies vegetales.

I.k Descripción del método de transformación;

a) Algodón Bollgard®

Para generar el algodón Bollgard® se introdujo el gen *cryAc* a las plantas de algodón de la variedad Coker 312 utilizando la cepa ABI de *Agrobacterium*. Los procedimientos utilizados para la transformación de explantes de hipocotilos de algodón con *Agrobacterium* fueron de acuerdo a los descritos por Umbeck *et al.*, 1987. La regeneración de las plantas se llevo a cabo siguiendo el procedimiento de Trolinder y Goodlin, 1987.

b) Algodón Bollgard®II

El algodón Bollgard®II evento 15985 se obtuvo mediante transferencia de los genes *cry2Ab* y *uidA* al algodón Bollgard® variedad DP50 B (que contenía los genes *cryAc*, *nptII* y *aad*). El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón DP50 B fue el de biobalística (John *et al.*, 1997) utilizando el plásmido B1579.



c) Tecnología Solución Faena Flex®

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

El algodón Bollgard® II/Solución Faena Flex® se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos MON 15985 (algodón Bollgard®II) y MON 88913 (algodón Solución Faena Flex®).

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

No aplica. Aparte del promotor y del terminador antes mencionados no se encuentra alguna otra secuencia incluida en el casete de expresión y sólo una copia de este se encuentra integrada en el genoma del algodón BG2F.

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 BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, expresa las siguientes proteínas novedosas provenientes de ambos eventos de transformación:



a) Proteína cp4 EPSPS

La secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS de 47.2 kDa (455 aminoácidos) codificada por el gen *cp4 epsps* se presenta enseguida:

```
1 mshgassrpa tarkssglsg tvripgdksi shrsfmfggl asgetritgl legedvintg
61 kamqamgari rkegdtwiid gvgnggllap eapldfgnaa tgcrltmglv gvydfdstfi
121 gdasltkrpm grvlnplrem gvqvksedgd rlpvtlrgpk tptpityrvp masaqvksav
181 llaglntpgi ttviepimtr dhstekmlqgf ganltvetda dgvrirtirleg rgkltgqvid
241 vpgdpsstaf plvaallvpg sdvtilnvlm nptrtglilt lqemgadiev inprlagged
301 vadlrvsst lkgvtvpedr apsmideypi lavaafaeg atvmngleel rvkesdrlsa
361 vanglkingv dcdegetslv vrgrpdkgl gnasgaavat hldhriamsf lvmglvsenp
421 vtvddatmia tsfpefmdlm aglgakiels dtkaa
```

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

b) Proteína Cry1Ac

La secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ac (1178 aminoácidos) codificada por el gen *cry1Ac* se presenta enseguida:



```

1 mdnnpnec ipynclsne vevlggerie tgytpidis1 sltqfllsef vpgagfvlg1
61 vdiiwgifgp sqwdaflvqi eqningree farnqaisrl eglsnlyqiy aesfrewead
121 ptnpalreem riqfndmnsa lttaiplfav qnyqvpllsa yvqaanlhls vlrdvsvfgq
181 rwgfdaatin sryndltrli gnytdyavr wntglervrg pdsrdwvryn qfrreltltv
241 ldivalfpny dsrrypirtv sqltreiytn pvlenfdgsf rgsaggers irsphlmdil
301 nsitiytdah rgyyywsgqh imaspvgsf pefthplygt mgnatpqqri vaqlgggvyr
361 tlsstlyrrp fniginnqql svldgtefay gtspnlpasv yrksgtvds1 deippqnnv
421 pprqgfshrl shvsmfrsgf snssvsiira pmfswihrsa efniiasds itqipavkgn
481 flfngsvig pgftggdlvr lnssgnniqs rgyievpihf pststryrvr vryasvtpih
541 lvnwgnssi fsntvpatat sldnlqssdf gyfesanaft sslgnivgvr nfgstagvii
601 drfefipvta tleaeynler aqkavnalf stnqlglktn vtdyhidqvs nltvylsdef
661 cldekrelse kvkhakrlsd ernllqdsnf kdinrperg wggstgitiq ggddvfkeny
721 vtlsgtfddec yptylyqkid esklkaftry qlrgyiedsq dleiyliryn akhetvnpvg
781 tgslwplsqa spigkcgepn rcaphlewnp dldcscrde kcahshhfs ldidvgctdl
841 nedlgvwvif kiktqdggar lgnlefleek plveealarv kraekkrwdk reklewetni
901 vykeakesvd alfvnsqydg lqadtniami haadkrvhsi reaylpelsv ipgvnaaife
961 elegriftaf slydarnvik ngdfnnglsc wnvkghvdve eqnqrsvlv vpeweeavsq
1021 evrvcpgrgy ilrvtaykeg ygegcvtihe iendtdelkf snceveeiyp nntvtcndyt
1081 vnqeeyggay tsrnrgynea pspadyasv yeeksytogr renpcefng yrdytplpvg
1141 yvtkeleyfp etdkvwieig etegtivids velllme

```

La proteína codificada por el gen *cry1Ac* introducido en el algodón Bollgard® es idéntica en longitud (1178 aminoácidos) y 99.4% idéntica en su secuencia de aminoácidos a la proteína codificada por el gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* subs. *Kurstaki* (Adang *et al.*, 1985). La secuencia codificante de este gen ha sido modificada para lograr su óptima expresión en plantas. La expresión del gen está dirigida por el promotor modificado (mejorado) 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.*, 1985; Kay *et al.*, 1987). La terminación transcripcional del mRNA proviene de la región 3' no traducida de la subunidad alfa del gen de la beta-conglicina de la soya (referido como secuencia de terminación 7S 3') (Schuler *et al.*, 1982).

c) Proteína NPTII

La secuencia de aminoácidos de la proteína NPTII (264 aminoácidos) codificada por el gen *nptII* se presenta enseguida:

```

1 mieqdgihag spaawverlf gydwaqqtig csdaavfrls aggrpvlfvk tdlsgalnel
61 qdeaarlswl attgvpcav ldvvtteagr wlllgevpgg dlsshlapa ekvsimadam
121 rrlhtldpat cpfdhqakhr ierartrmea glvdqddlde ehqglapael farlkarmpd
181 gedlvvthgd aclpnimven grfsgfidcg rlgvadryqd ialatrdiae elggewadrf
241 lvlygiaapd sqriafyrll deff

```

El gen *nptII* fue aislado del transposón Tn5 (Beck *et al.*, 1982). Este gen codifica para la expresión de la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII), la cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglicosídicos kanamicina y neomicina. La enzima NPTII



usa el ATP para fosforilar la neomicina y la kanamicina e inactiva el antibiótico evitando su efecto en las células que producen la proteína NPTII. Esta proteína está ampliamente distribuida en el ambiente y las cadenas alimenticias en microorganismos resistentes a la kanamicina que se encuentra de manera natural en el suelo y en los sistemas digestivos de los mamíferos (Falvell *et al.*, 1992).

La expresión del gen *nptII*, presente tanto en el algodón Bollgard® como en el algodón Solución Faena® está controlada por el promotor CaMV 35S (Odell *et al.*, 1985). La terminación transcripcional del mRNA proviene de la región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (*nos*) del plásmido pTiT37 de la cepa T37 de *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982). El gen *nptII* funciona como marcador de selección en las primeras etapas de selección de células transformadas del algodón en el laboratorio (De Block *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1984), permitiendo a las células modificadas desarrollarse en un medio de cultivo selectivo.

d) Proteína AAD

La secuencia de aminoácidos de la proteína AAD (263 aminoácidos) codificada por el gen *aad* se presenta enseguida:

```
1 mreaviaevs tqlsevvgvi erhleptlla vhlygsavdg glkphsdidl lvtvtvrld  
61 ttrralindl letsaspges eilravevti vvhddiipwr ypakrelqfg ewqrndilag  
121 ifepatidid lailltkare hervalvgpaa eelfdpvpeq dlfealnetl tlwnsppdwa  
181 gdernvvtl sriwysavtg kiapkdvaad wamerlpaqy qpvillearqa ylgqeedrla  
241 sradqleefv hyvkgeitkv vgk
```

El gen de resistencia a antibióticos *aad* fue aislado del transposón bacteriano Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomina (Davies & Benveniste, 1974). Este gen codifica la expresión de la enzima 3'(9)-O-aminoglicosido adeniltransferasa (AAD) y está bajo el control de su propio promotor bacteriano. El gen *aad* fue usado en el laboratorio, en la fase previa a la transformación genética de las células de algodón, para seleccionar las bacterias que contenían el plásmido con el ADN de interés.

**e) Proteína Cry2Ab**

La secuencia de aminoácidos de la proteína Cry2Ab (633 aminoácidos) codificada por el gen cry2Ab se presenta enseguida:

```

1 mnsvlnsgrt ticdaynvaa hdpfsfqhks ldtvqkewte wkknhslyl dpivgtvasf
61 llkkvgslyg krilselrnl ifpsgstnlm qdilretekf lnqrlnrtdtl arvnaeltgl
121 qanveefnrq vdnflnprn avplsitssv ntmqqlflnr lpqfqmgyyq llllplfaqa
181 anlhlsfird vilnadewgi saatlrtyrd ylknytrdys nycintyqsa fkglntrlhd
241 mleftrymfl nvfeyvsiws lfkyqsllvs sganlyasgs gpqqtqsfts qdwpflyslyf
301 qvnsnyvlnq fsgarlsntf pnivglpgst tthallaarv nysggissgd igaspfnqnf
361 ncstflppll tpfvrswlds gsdregvatv tnwqtgsfet tlglrsgaft argnsnyfnd
421 yfirnisgvp lvvrnedlrr plhyneirni aspsgtppga raymvsvynr knnihavhen
481 gsmihlapnd ytgftispih atqvnnqtrt fisekfgnqg dsrlrfeqnt tarytlrgng
541 nsynlylrvs signstirvt ingrvytatn vntttndgv ndngarfdsi nignvvasn
601 sdvpldinvt lnsqtqfdlm nimlvptnis ply

```

El gen cry2Ab es una versión sintética mejorada del gen nativo de *Bacillus thuringiensis* Subs. *Kurstaki*. La modificación fue necesaria para proveer secuencias controladoras que permitieran una mejor expresión del gen en las plantas de algodón. El gen cry2Ab con su región promotora fue clonado dentro de *Bacillus thuringiensis* cepa EG7699. El producto de la expresión del gen cry2Ab (GenBank accesión No. X55416) tiene una longitud de 633 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 71 kDa (widner and Whiteley, 1990; Dankocsik *et al.*, 1990).

f) Proteína GUS

La secuencia de aminoácidos de la proteína GUS (603 aminoácidos) codificada por el gen de la β -glucuronidasa se presenta enseguida:

```

1 mvrpvetptr eikkldglwa fsldrencgi dqrwwesalq esraiavpgs fndqfadadi
61 rnyagnvwyq revfipkgwa gqrivlrfa vthygkvwn nqevmehqgg ytpfeadvtp
121 yviagksvri tvcvnnelnw qtippgmvit dengkkkqsy fhdffnyagi hrsvmllytpp
181 ntwvdditv thvaqdcnha svdwqvang dvsveldad qqvvatgqgt sgtlqvvnph
241 lwqpeggyly elcvtaksqt ecdiyplrvq irsvavkgeq flinhkpfyf tgfgrhedad
301 lrgkgfdnvl mvhdhalmdw igansyrts ypyaeemldw adehgivvid etaavgfnls
361 lgigfeagnk pkelyseeav ngetqqahlq aikeliardk nhpsvwmwsi anepdtrpqq
421 areyfaplae atrkldprrp itcvnmfcd ahtdtisdlf dvlclnryyg wyvqsgdlet
481 aekvlekell awqeklhqpi iiteygvdtl aglhmymtdm wseeqqcawl dmyhrvdrv
541 savvgeqwn fadfatsqgi lrvggkkgi ftrdrkpkksa aflqkrwtg mnfgekpqqq
601 gkq

```

El gen de la β -glucuronidasa, *uidA*, también conocido como *gus* o gen de *gusA*, se deriva de la *Escherichia coli* cepa K12 (Jefferson *et al.*, 1986). La β -D-glucuronidase es una exohidrolasa que cataliza la hidrólisis de una gama de β -glucuronides en sus ácidos



correspondientes y los aglycones (Oshima *et al.*, 1987), incluyendo el substrato artificial p-nitrofenil- β -D-glucuronide. La hidrólisis de este compuesto cromogénico artificial libera un tinte azul que funciona como marcador visible y cuantificable en los procesos de transformación de plantas (Jefferson *et al.*, 1987). La actividad bioquímica y catalítica de esta proteína ha sido estudiada a fondo (Wang and Touster, 1972). Esta proteína se utiliza como marcador que se puede rastrear para identificar aquellas células que serán útiles en el proceso de regeneración.

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

La tolerancia al herbicida Faena Fuerte con Transorb® y resistencia a insectos lepidópteros plaga conferida al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® por expresión de los genes *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 y *cry1Ac* y *cry2Ab* de *Bacillus thuringiensis*, respectivamente, son las características fenotípicas conferidas; la proteína CP4 EPSPS así como las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab no tienen efectos sobre el metabolismo normal de la planta. No se espera que la expresión de las características acumuladas en las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® produzcan efectos interactivos o sinérgicos sobre el metabolismo de las plantas porque involucran distintos mecanismos de acción. La proteína CP4 EPSPS pertenece a la familia de las sintasas EPSPS, las cuales son enzimas involucradas en la penúltima fase de la ruta bioquímica del shikimato para la producción de aminoácidos aromáticos en los cloroplastos de las plantas es tolerante a glifosato y las proteínas Cry actúan mediante acción tóxica selectiva en el intestino de insectos blanco; cada una de las proteínas Cry tiene un receptor específico diferente) y tienen distintos sitios de ubicación en la célula vegetal (la proteína CP4 EPSPS y la Cry2Ab tienen localización en cloroplasto y la Cry1Ac en citoplasma).

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

La proteína Cry1Ac es termolábil y se degrada rápidamente, en menos de 30 segundos, bajo fluidos gástricos simulados de mamíferos (Fuchs *et al.*, 1993). Ninguna de las dos proteínas (Cry1Ac y Cry2Ab) presenta características comunes a las proteínas alergénicas de alimentos. La comparación con las secuencias depositadas en los bancos de datos no ha mostrado similitud



de significancia biológica entre las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab con alérgenos conocidos (Metcalf *et al.*, 1996b). La proteína Cry1Ac en dosis aguda de hasta 4300 mg/kg de peso corporal no ocasiona efectos adversos en ratón (Naylor, 1993a; Naylor, 1993b). De igual forma en estudios de toxicidad oral con ratones empleando la proteína Cry2Ab en dosis de hasta 1450 mg/kg no han mostrado efectos adversos (Bechtel, 1999). Diferentes estudios sobre toxicidad oral aguda de preparaciones microbianas de Bt, conteniendo Cry1Ac y Cry2Aa (alto grado de similitud con Cry2Ab) en mamíferos tales como ratas y conejos han mostrado que no se presentan efectos adversos en dosis muy elevadas (Barbera, 1995; Carter & Liggett, 1994; McClintock *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 1996). Dos estudios por separado en humanos no han encontrado efectos sobre la salud en dosis orales de 1000 mg de esporas de Bt por día durante 3 o 5 días (Betz *et al.*, 2000; McClintock *et al.*, 1995).

La bacteria *Agrobacterium sp.* cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizosfera de las plantas. Únicamente el gen *cp4 epsps* de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes a herbicidas agrícolas de la familia Faena. La secuencia del ADN transferido y de la proteína producida es completamente conocida y se encuentra presente en todas las plantas y en la mayoría de los microorganismos que comúnmente son parte de nuestra dieta, y no existe evidencia de que esta proteína pueda causar algún efecto negativo en la salud humana o de cualquier otro vertebrado. Adicionalmente, no se espera que los humanos estén expuestos a la proteína CP4 EPSPS expresada por el algodón Bollgard II®/Solución Faena Flex® ya que durante el procesamiento para la obtención de aceite de algodón utilizado para el consumo humano no se reporta la presencia de proteína (Fuchs, 1994).

La proteína CP4 EPSPS no presenta homología con las secuencias de aminoácidos de las proteínas tóxicas y alérgicas de las bases de datos Pir Protein, Swissprot (Bairoch and Boeckmann, 1993) y Genpept (Benson *et al.*, 1993). La secuencia de aminoácidos o regiones de alta homología entre dos o más proteínas puede proveer información importante sobre la actividad biológica de una proteína. Es decir, la secuencia de aminoácidos puede proveer información acerca de las propiedades estructurales, hidrofóbicas e hidrofílicas, inmunogenicidad, estabilidad y la posible función de la proteína identificada. El uso de bases de datos ha demostrado ser una excelente herramienta para predecir la función biológica de proteínas desconocidas. La secuencia de la proteína CP4 EPSPS fue comparada con las



secuencias peptídicas identificadas como “alérgenos” y “toxinas” de todas las bases de proteínas disponibles para identificar si la proteína CP4 EPSPS tiene alguna homología con alérgenos o toxinas.

Los resultados muestran que no existe ninguna homología significativa entre las secuencias de los alérgenos y toxinas conocidas y la secuencia de la proteína CP4 EPSPS. La conclusión de que esta proteína no es tóxica está apoyada en los resultados de estudios de toxicología aguda en ratones, donde no se encontró ninguna evidencia de efectos tóxicos en los animales de prueba cuando se administró una dosis de 572 mg/kg de la proteína CP4 EPSPS (Naylor, 1993).

La introducción de variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® tolerantes al herbicida glifosato no posee ningún riesgo de provocar reacciones alérgicas. El aceite de la semilla de algodón es el producto más utilizado para el consumo humano y los antecedentes que reportan el análisis del aceite derivado de variedades Bollgard®/Solución Faena® confirmaron que no existe proteína CP4 EPSPS detectable en el aceite para uso industrial (Fuchs, 1994). Con base en estos resultados no se espera un consumo humano significativo de esta proteína. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS no muestra homología con ninguna de las secuencias de los alérgenos en las tres bases de datos de proteínas actuales (Mitsky, 1993; Genpet, Pir protein y Sw issprot) y, por lo tanto, se concluye que la proteína CP4 EPSPS no presenta ningún potencial de alergenicidad para los humanos.

Adicionalmente, la proteína CP4 EPSPS es rápidamente desnaturalizada por el calor y la digestión enzimática y ácida en fluidos gástricos simulados (ANZFA, 2001b; Canadian Food Inspection Agency 1997; Harrison, *et al.*, 1996). La proteína no presenta homología con la secuencia peptídica de alérgenos depositados en las bases de datos Genpept, Pir y Sw issProt (Mitsky, 1993).

La autoridad alimentaria de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) ha concluido que los alimentos derivados del algodón Roundup Ready® (Solución Faena®), que expresa la misma proteína CP4 EPSPS que el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®, son tan seguros como aquellos derivados de variedades convencionales (ANZFA, 2000). De igual modo la EPA de los Estados Unidos ha brindado de excepción para el requisito de una tolerancia a residuos de la proteína CP4 EPSPS.



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

Secuencia de ADN del promotor P35S3

```
GAATTCCAAATCCACAAAAATCTGAGCTTAAACAGCACAGTTGCTCCTCTCAGAGC
AGAATCGGGTATTCAACACCCTCATATCAACTACTACGTTGTGTATAACGGTCCA
CATGCCGGTATATACGATGACTGGGGTTGTACAAAGGCGGCACAAACGGCGTTC
CCGGAGTTGCACACAAGAAATTTGCCACTATTACAGAGGCCAAGAGCAGCAGCTGA
CGCGTACACAACAAGTCAGCAAAACAGACAGGTTGAACTTCAATCCCAAAGGAGAA
GCTCAACTCAAGCCCAAGAGCTTTGCTAAGGCCCTAACCAAGCCCAACAAAGCAAA
AAGCCCACTGGCTCAGCCTAGGAACCAAAAGGCCAGCAGTGAATCCAGCCCAAA
AGAGATCTCTCTTTGCCCGGAGATTACAATGGACGATTTCTCTATCTTTACGAT
CTAGGAAAGGAAGTTTGAAGGTGAAGGTGACGACACTATGTTCAACCACTGATAATG
AGAAGGTTAGCCCTTTC AATTTTCAGAAA GAATGCTGACCCACAGATGGTTAGAGA
GGCCTACGCAGCAGGTCATATCAAGACGATCTACCCGAGTAACAATCTCCAGGAG
ATCAAATACCTTCCAAAGAAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAAAGATTCAGGACTAAAT
GCATCAAAGAACACAGAGAAAAGACATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGT
ATGGACGATTCAAGGCTTGCCTTCATAAAACCAAGGCCAAGTAATAGAGATTGGAGTC
CTAAAAAGGTTAGTTCTTACTGAAATCTAAGGCCATGCATGGAGTCTAAGATTCAA
ATCGAGGATCTAACAGAACTCGCCGTGAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTC
TTTTACGACTCAATGACAAGAA GAAAAATCTTCTGTC AACATGGTGGAGCACGACAC
CTGGTCTACTCCAAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAAAGGGCTATT
GAGACTTTTTCAACAAAGGATAATTTTCGGGAAACCTCTCCTCGGATTCATTGCCAG
CTATCTGTC ACTTCAATCGAAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATG
CCATCATTGCCGATAAAGGAAAGGCTATCATTC AAGATGCCCTCTGCCGACAGTGGT
CCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATC GTGGAAAAAGAACGTTCCAA
CCACGTC TTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGA
CGCACAAATCCACTATCTCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATAATAAGGAAGTTCAATTT
CAATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCAC CAGTCTCTCTCTATAAATCTATCTCTCT
CTCTATAACC
```

Secuencia de ADN del terminador 3'nos

```
CGAAGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAAATCCGTGTT
GCCGGTCTTGGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTAAGTTAAGCATGTAA
TAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGT
CCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAA CAAAATATAGCGCGCAAAC TAG
GATAAATTAATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCG
```

Ninguna de las secuencias reguladoras pertenece a la especie receptora. El promotor y terminador utilizados para la expresión de la proteína cp4 epsps son ampliamente descritas en Klee, Muskopf and Gasser, 1987.



```

1851 AAAATGGCCT CCATTATTTG GCTTATTCAA TCAAAAAGTTT ACAAACACTAG
1901 TGCAAATTTA ATATGATAAT GTCTACAAGA ACCAAATACG AATTGAGTAA
1951 ATTTTTTTTG CTAAAATAAA TTACGAATTG ATGAATTATC ATTTTAAAAA
2001 GTTCTTTTAA ACCATTTCTT TTAAGTAAAT AAAAAAAGGT TTTATTAATC
2051 ATATATATTA CAAATTACC C ATTAAGTAGC CAAATTACAA ATTTTAATTC
2101 AATGTAGTCA AACACTGATA GTTTAAACAT GACTCTCTTA AGGTAGCCAA
2151 AGCCCGGGCT TAATTAAGGC GCGCCGGCCA AGTCGGCCGC GGCCTGCTTA
2201 TCAAGCTTCT GCAGGTCTCG CTGAGTGGGA AGCTAATTCT CAGTCCAAAG
2251 CCTCAACAAG CTCAGGGTAC AGAGTCTCCA AACCATTAGC CAAAAGCTAC
2301 AGGAGATCAA TGAAGAATCT TCAATCAAAG TAACTACTG TTCCAGCACA
2351 TGCAATCATG TCAGTAAAGT TCAGAAAAAG ACATCCACC GAGACTTAAA
2401 GTTAGTGGGC ATCTTTGAAA GTAATCTTGT CAACATCGAG CAGCTGGCTT
2451 GTGGGGACCA GACAAAAAAG GAATGGTGCA GAATTGTTAG GCGCACCTAC
2501 CAAAAGCATC TTTGCCTTTA TTGCAAAGAT AAAGCAGATT CCTCTAGTAC
2551 AAGTGGGGAA CAAAATAACG TGGAAAAGAG CTGTCCTGAC AGCCCACTCA
2601 CTAATGCGTA TGACGAACGC AGTGACGACC ACAAAGAAT TAGCTTGAGC
2651 TCAGGATTTA GCAGCATTCC AGATTGGGTT CAATCAACAA GGTACGAGCC
2701 ATATCACTTT ATTCAAATTG GTATCGCCAA AACCAAGAAG GAACTCCCAT
2751 CCTCAAAGGT TTGTAAGGAA GAATTCGATA TCAAGCTTGA TATCGGAAGT
2801 TTCTCTCTTG AGGGAGGTTG CTCGTGGAAT GGGACACATA TGGTTGTTAT
2851 AATAAACCAT TTCCATTGTC ATGAGATTTT

```

Sequence Illustration

1 - 2106 Plant DNA
2107 - 2880 P-FMV/TSF1/EF-1 α

Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen TSF1 de *Arabidopsis thaliana* y secuencias potenciadas del promotor 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (FMV) (<http://gmdd.shgmo.org>).



```

1 TGACCGAAGT TAATATGAGG AGTAAACAC TTGTAGTTGT ACCATTATGC
51 TTATTCACTA GGCAACAAAT ATATTTTCAG ACCTAGAAAA GCTGCAAATG
101 TTACTGAATA CAAGTATGTC CTCTTGTGTT TTAGACATT ATGAACTTTC
151 CTTTATGTAA TTTTCCAGAA TCCTTGTFCAG ATTCTAATCA TTGCTTTATA
201 ATTATAGTTA TACTCATGGA TTTGTAGTTG AGTATGAAAA TATTTTTTAA
251 TGCATTTTAT GACTTGCCAA TTGATTGACA ACATGCATCA ATCGACCTGC
301 AGCCACTCGA GTGGAGGCC CTCTAAGCC CCCATTTGGA CGTGAATGTA
351 GACACGTCGA AATAAGGATT TCCGAATTAG AATAATTGT TTATTGCTTT
401 CGCCTATAAA TACGACGGAT CGTAAATTGT CGTTTTATCA AAATGTACTT
451 TCATTTTATA ATAAAGCTGC GGACATCTAC ATTTTTGAAT TGAAAAAATA
501 TTGGTAATTA CTCTTTCTTT TTCTCCATAT TGACCATCAT ACTCATTGCT
551 GATCCATGTA GATTTCCCGG ACATGAAGCC ATTTACAATT GAATATATAT
601 TACAAAGCTA TTTGCTTATA ACATATGCGA AAAATTTGT ACTATAATCA
651 GGGGTAAATT TAGGAGGGGG CTGTAGGTC TCGCTTCTCT TAAAATGAAA
701 AATTTTCTAT TTAGTTATTT AAAATTTTAA AAGTAAAATA TAAAATTTTC
751 ATTTAATCCT TTA AAAATTA TAAAGATATA GACTATTAAT ATGATGAAAT
801 TACAATTTTA TTATCATAAA AATTATAATT TAATTTGAC CCCTAACAAA
851 ATTTTCTGAT TTTGCCCTA ACTGTAAAT TTGTATAAAA ACATTTTCTT
901 TTTGCATTIA ATGATTTCTT TAATTCAGTC CAAGAAAAGAA ATTATTAAT
951 TGCATATGCG AAAGTTAGTC CTGTCCTAGT GATATTAAG GAAAGAAAACA

```

Sequence Illustration

1- 300 E9

301- 598 plasmid flanking

599- 1675 Plant DNA

Secuencia de DNA derivada de *Pisum sativum* conteniendo la región 3' no traducida del gen rbc E9 codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa1, bifosfato carboxilasa de chícharo (<http://gmdd.shgmo.org>).

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

De los organismos donadores:

a) *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva, facultativa anaeróbica que forma inclusiones de proteína adyacente a la endospora. Las subespecies de Bt pueden sintetizar más de una inclusión parasporal. Estas inclusiones están formadas por diferentes proteínas cristal insecticida (PCI). Los cristales o el complejo de espora/cristal de un Bt esporulado deben ser ingerido por las larvas susceptibles. La eficacia de los cristales en el intestino medio del insecto depende de la solubilización de los cristales, de la conversión de la protoxina a la toxina biológicamente activa por las enzimas proteolíticas, de los receptores específicos ensamblado por el dominio terminal-C de la toxina activa y la formación de un poro por el dominio terminal-N con el rompimiento de las células epiteliales. La germinación de la espora y la proliferación de las células vegetativas dentro del homocelo del insecto podrían resultar en una septicemia contribuyendo a la muerte del insecto. Los receptores

ensamblados por el cristal es el principal determinante de la especificidad del hospedero debido a la existencia de diferentes cristales presentes en cada una de las cepas de Bt.

La proteína producida en el algodón Bollgard (CryIAc) es 99.4% idéntica a la proteína producida por *Bacillus thuringiensis* subespecies *kurstaki* (B.t.k.) de la cepa HD-73. Esta cepa controla insectos plagas por la producción de las proteínas cristal insecticida conocidas como delta-endotoxinas. La proteína delta-endotoxina producida por varias subespecies de Bt exhiben diferencias en la secuencia de aminoácidos para el dominio terminal amino de las proteínas. Estas diferencias son importantes en la acción selectiva contra ciertos insectos plagas. Lo más importante, la acción de la proteína de Bt no tienen efecto contra organismos no blancos tales como los peces, aves y mamíferos debido a que tienen los receptores en el intestino medio. Esto explica la ausencia de toxicidad de la proteína delta endotoxina de B.t.k. a los organismos no blancos. La proteína B.t.k. expresada en el algodón Bollgard® muestra especificidad solamente a los insectos del orden lepidóptera y no tiene ningún efecto dañino sobre los organismos no blancos.

Cry2Ab es una versión sintética mejorada del gen nativo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. La modificación fue necesaria para proveer secuencias controladoras que permitieran una mejor expresión del gen en las plantas de algodón. El gen *cry2Ab* con su región promotora fue clonado dentro de *Bacillus thuringiensis* cepa EG7699. El producto de la expresión del gen *cry2Ab* fue aislado y purificado de la cepa bacteriana modificada EG7699. La proteína *Cry2Ab* (GenBank Acceso No. X55416) tiene una longitud de 633 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 71 kDa (Widner and Whiteley, 1990; Dankocsik *et al.*, 1990).

b) *Agrobacterium* sp. cepa CP4

Agrobacterium tumefaciens es un fitopatógeno que habita de manera natural en el suelo, el cual utiliza un proceso de ingeniería genética natural para alterar la maquinaria metabólica de las células de la planta hospedante. Este proceso hace que las plantas hospedantes desvíen suministros de carbono y nitrógeno orgánico para la producción de nutrientes (opinas) que pueden ser específicamente catabolizados por la bacteria invasora (Tempe and Schell, 1977). Las células infectadas son inducidas a proliferar. La enfermedad de la agalla de la corona es

el resultado directo de la incorporación de una región de ADN-transferible (ADN-T), del plásmido circular Ti (inducción de tumor) de 150 a 250 kB, transferido por *A. tumefaciens* dentro del genoma de la planta hospedante. Cuando *Agrobacterium* es aislada de las raíces de las plantas en ambientes naturales o bajo cultivo, la mayoría de las cepas (más del 90%) no son patogénicas, aún cuando muchos aislamientos son hechos de plantas enfermas. Por lo tanto, *Agrobacterium* es esencialmente un habitante de la rizosfera y únicamente una proporción muy pequeña de cepas son fitopatógenas (contienen el plásmido Ti), las cuales causan la enfermedad conocida como agalla de la corona en un amplio rango de plantas dicotiledóneas especialmente rosáceas como manzana, pera, durazno, cereza, almendra, frambuesa y rosál. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de un tumor al nivel del suelo y aunque reduce el valor comercial de la cosecha, generalmente no causa problemas serios en plantas maduras bien establecidas. La bacteria entra a la planta a través de heridas y transfiere una fracción de su ADN, denominada ADN-T, a las células de las plantas causando la formación de un tumor. El tumor se desarrolla debido a que el ADN-T contiene genes que regulan la biosíntesis de hormonas vegetales como el ácido indolacético y citocininas. Las células infectadas producen unas sustancias denominadas opinas, las cuales son usadas por la bacteria como fuente de energía. El desarrollo de los síntomas en la planta infectada depende de la temperatura, humedad y estado de crecimiento; conforme el tumor incrementa su tamaño la habilidad de la planta para obtener nutrientes disminuye y finalmente detienen su crecimiento con lo cual también empieza la decadencia del tumor liberando las bacterias en el suelo. La bacteria puede permanecer activa en el suelo o en tumores viejos en ausencia de un hospedero adecuado durante un mínimo de dos años y puede dispersarse a través del movimiento de suelo infectado, implementos agrícolas, escurrimiento de agua o a través de insectos succionadores de savia (López, 1994). Generalmente las bacterias se reproducen por bipartición. Tras la duplicación del ADN, dirigida por la ADN-polimerasa que se encuentra en los mesosomas, la pared bacteriana crece hasta formar un tabique transversal separando las dos nuevas bacterias. Además de este tipo de reproducción asexual, las bacterias poseen mecanismos de reproducción sexual, mediante los cuales se intercambian fragmentos de DNA, los cuales pueden ser:

- Transformación: Consiste en el intercambio genético producido cuando una bacteria es capaz de captar fragmentos de ADN, de otra bacteria que se encuentran dispersos en el medio donde vive.

- **Conjugación:** En este proceso, una bacteria donadora F+ transmite a través de un puente o pili, un fragmento de DNA, a otra bacteria receptora F-. La bacteria que se llama F+ posee un plásmido, además del cromosoma bacteriano (intercambio de plásmido entre bacterias compatibles).
- **Transducción:** En este caso la transferencia de ADN de una bacteria a otra, se realiza a través de un virus bacteriófago, que se comporta como un vector intermediario entre las dos bacterias. Algunas bacterias encontradas en el suelo como las especies fitopatógenas del género *Agrobacterium* pueden transferir DNA a las plantas a través del mecanismo denominado transformación (transferencia viral de DNA dentro de una bacteria) (Morrison, 1996; Davison, 1999; Thomson, 2000).

En general la habilidad de las bacterias para aceptar ADN del ambiente varía marcadamente entre las diferentes especies y la frecuencia de transformación, aún bajo condiciones ideales, es muy baja. *Agrobacterium tumefaciens* son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gramnegativas, flageladas, peritricas; forma colonias mucoides y blancas. La composición de bases de DNA varía de 58 a 63.5% GC.

c) Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV)

El Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) es un Caulimovirus presente en la naturaleza en plantas crucíferas (col, coliflor, colza, mostaza); también se ha reportado en cacahuate, soya y casava. Los Caulimovirus representan uno de los dos grupos de pararetrovirus vegetales que incluye al promotor 35S. El otro grupo, Badnavirus, se encuentra en forma natural en banana, cacao, cítricos, camote, piña y caña de azúcar. Las partículas del CaMV contienen una molécula circular de DNA de doble cadena. En el núcleo de las plantas huéspedes el DNA se presenta como minicromosoma cuya transcripción produce moléculas de RNA. Este RNA es el templado para la transcriptasa reversa que produce copias de ADN del CaMV que será empacado en nuevas partículas virales. El RNA se utiliza para la síntesis directa de proteínas virales dentro de las que se incluye las que integran la cápside.

d) Figwort Mosaic Virus (FMV/CMoVb; Virus del Mosaico de la *Scrophularia*)

Caulimovirus del grupo pararetrovirus, muy similar al virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Se reportó por primera vez en *Scrophularia californica* en 1982. Familias con hospederos

susceptibles: Scrophulariaceae. Los viriones no presentan envoltura; nucleocápsides isométricas de 50 nm de diámetro, redondas. Los viriones contienen una molécula de DNA de doble cadena circular (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002). El FMV ha sido secuenciado y se han encontrado ocho marcos de lectura abiertos, siete de los cuales corresponden en tamaño y localización al CaMV. Se han desarrollado vectores de expresión en plantas empleando secuencias del FMV (Matai *et al.*, 1997). El promotor del FMV se ha caracterizado y se tiene que es constitutivo en la mayoría de los tejidos vegetales, su fuerza es comparable o más fuerte que el promotor CaMV y mucho mayor que el promotor de la nopalina (Sanger *et al.*, 1990; Matai *et al.*, 1997). El promotor del FMV posee doble potenciadores y el eliminar uno reduce su actividad en 75%. El FMV posee señales de poliadenilación similares al CaMV. El FMV es un promotor útil alternativo al promotor del CaMV para el desarrollo de plantas GM.

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 gossipol y ácidos grasos ciclopropenoides (CPFA, cyclopropenoid fatty acids), los cuales son tóxicos naturales.

El gossipol 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 gossipol 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 gossipol 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 gossipol unido de esta manera no está disponible para los animales.

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).

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 reportero *uidA* y la proteína codificada.

Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen el gen reportero *uidA*. Este gen fue empleado como marcador en el laboratorio para seleccionar satisfactoriamente las células de algodón modificado Bollgard®II durante el proceso de transformación. El gen *uidA* proviene de la bacteria *Escherichia coli* y codifica para la enzima beta glucuronidasa (GUS). La enzima GUS transforma un sustrato incoloro a un producto de color azul en un ensayo sencillo y es utilizada como un “marcador” reportero para detectar tejidos que han sido transformados satisfactoriamente. La exposición de tejidos vegetales que contienen la enzima GUS a este sustrato facilita la cuantificación de la expresión del gen *uidA* (Jefferson *et al.*, 1986).



Los genes de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* y las proteínas que codifican.

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contiene los genes marcadores de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* provenientes de *Escherichia coli*. Estos genes fueron empleados durante los pasos iniciales de trabajo de laboratorio para el desarrollo de las plantas de algodón Bollgard®II a fin de permitir la selección de células que contenían la modificación genética deseada. Ambos genes se emplean comúnmente como marcadores de selección durante la obtención de plantas GM. El gen *nptII* fue aislado a partir del transposón Tn5 (Beck *et al.*, 1982) y codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPT II), que confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina y la neomicina. La enzima NPT II utiliza ATP para fosforilar kanamicina y neomicina, inactivando así los antibióticos y previniendo la muerte de las células que producen NPT II. El gen *npt II* funciona como un marcador de selección en los pasos iniciales de laboratorio donde se seleccionan las células de algodón que han sido modificadas genéticamente, permitiendo su desarrollo mientras que se inhibe el crecimiento de las células que no han sido transformadas. La enzima NPT II se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y en la cadena alimenticia; los microorganismos resistentes a kanamicina se presentan en forma natural en el suelo y en los sistemas digestivos de mamíferos (Flavell *et al.*, 1992). La expresión del gen *nptII* en las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® está controlado por el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y se utiliza como región terminadora del mRNA la del gen *nos* de *A. tumefaciens*. El gen *aad* fue utilizado en el laboratorio, antes de la producción de las plantas genéticamente modificadas, para selección en bacterias que contenían el plásmido con la construcción a utilizar en la transformación del algodón. Este gen fue aislado del transposón Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina (Davies & Benveniste 1974). El gen *aad* no se expresa en las plantas de algodón debido a que se encuentra bajo el control de su promotor bacteriano, el cual no es activo en plantas y no se han adicionado los elementos genéticos necesarios para su expresión en plantas.

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

El algodón Bollgard®II contiene una copia completa de los genes transferidos, mismos que se integraron de manera estable al genoma del algodón.

Datos de segregación a través de cuatro generaciones se compararon y la frecuencia de los individuos esperados con los observados que expresaban la proteína cry2Ab. La expresión de la proteína Cry2Ab se analizó mediante ELISA. Todas las generaciones segregaron una sola



inserción del gen cry2Ab. La presencia de la proteína Cry2Ab a través de múltiples generaciones siguió el patrón de herencia mendeliana. La presencia del gen cry2Ab fue confirmada mediante análisis Southern blot.

La estabilidad de la inserción se demostró mediante un análisis Southern blot de ADN genómico de muestras tomadas de tejido de hojas a través de cinco generaciones. No hubo diferencias en el patrón de hibridación entre los fragmentos de ADN extraído de cualquiera de las cinco generaciones. Estos resultados demuestran que la inserción de ADN plásmido PV-GHBK11 es estable en el genoma de plantas a través de cinco generaciones de mejoramiento.

El algodón Solución Faena Flex® se ha llevado por cinco generaciones de retrocruzas sin pérdida del fenotipo de tolerancia a glifosato o rearrreglo de los elementos genéticos transferidos. El material genético y los segregantes del material transferido no presentan el fenotipo de tolerancia al herbicida. Datos obtenidos de análisis de hibridación Southern indican que todos los elementos genéticos transferidos, incluyendo regiones codificantes, promotores y regiones no codificantes, se encuentran presentes como insertos únicos de manera estable en el algodón Solución Faena Flex® (MON 88913) y de que no se encuentran secuencias del vector no requeridas.

La estabilidad de la tolerancia a glifosato se evaluó mediante análisis Southern blot. La primera generación resultante de la auto polinización segregaron en una proporción 3:1 (resistentes y no resistentes). Generaciones avanzadas (R4 y R5) de plantas homocigotas auto polinizadas segregaron en una proporción 1:0. Estos resultados no son significativamente diferentes a lo esperado de acuerdo la herencia mendeliana; y confirman la homocigosis y estabilidad del carácter dominante a través de múltiples generaciones.

I.t Referencia bibliográfica sobre los datos presentados

<http://www.agbios.com>



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

Se realizará la liberación del algodón BG2F Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) en una superficie de 20 000 ha, las cuales quedan contenidas en el polígono que se anexa en el siguiente inciso. Se importará 340,000 kg de semilla (En el [anexo 1](#) se presentan más detalles).

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

Cuadro 5. Los Polígonos de liberación al ambiente tienen los extremos:

Zonas Agrícolas de Aldama, Chihuahua					
Vértice	Latitud	Longitud	X	Y	Zona
0	30.06409	-105.6858	433897.9281	3326085.257	13
1	29.29365	-105.2448	476224.1614	3240545.072	13
2	28.55245	-105.933	408734.9796	3158757.729	13
3	28.43797	-106.30116	372581.6209	3146409.145	13
4	29.56833	-106.48039	356597.6815	3271868.683	13
5	29.63057	-106.21373	382502.8775	3278465.999	13
6	29.61986	-106.04112	399203.0357	3277116.617	13
7	29.66454	-106.05979	397440.6763	3282084.072	13
8	29.71403	-105.8804	414843.3435	3287422.546	13
Zonas Agrícolas de Camargo, Chihuahua					
0	28.29341	-103.48019	649034.5364	3130642.617	13
1	27.44838	-103.74369	624152.6239	3036726.505	13
2	27.64265	-104.32986	566106.8028	3057797.264	13
3	27.86671	-104.87948	511864.3844	3082443.118	13
4	28.01835	-104.90433	509404.9243	3099238.774	13
5	28.45569	-104.88749	511015.3858	3147688.307	13
6	28.45414	-104.97342	502602.3743	3147511.729	13
7	28.81853	-105.03589	496498.2282	3187881.083	13
8	28.63409	-104.73012	526378.3868	3167476.784	13
9	28.62734	-104.24037	574252.9109	3166935.051	13

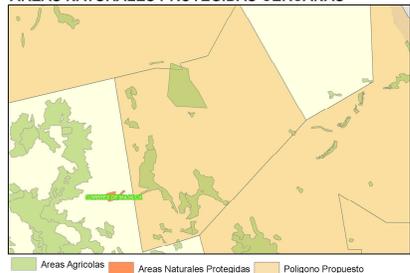


ANEXO: POLIGONO DE LIBERACION PROPUESTO PARA ALDAMA, CHIHUAHUA

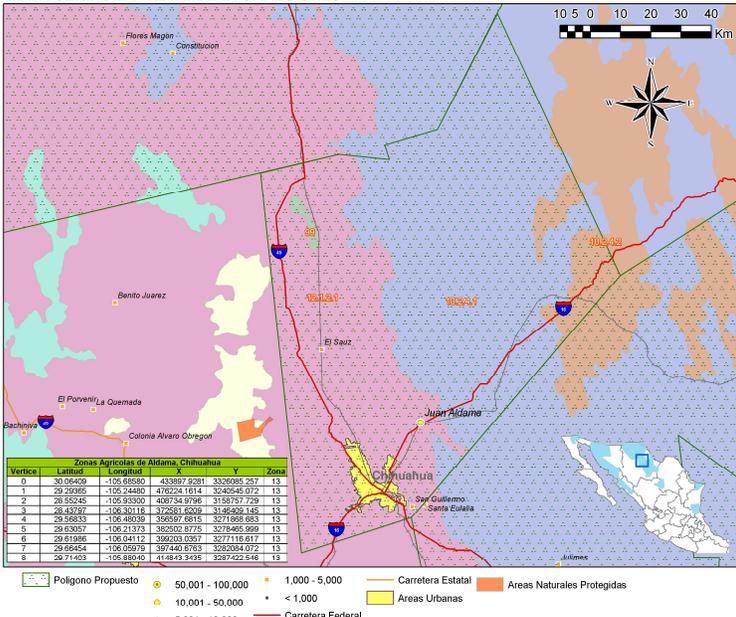
MUNICIPIOS CUBIERTOS



AREAS NATURALES PROTEGIDAS CERCANAS



MAPA GENERAL Y CLAVE DE ECORREGIONES



Nota:

La determinación de los polígonos de liberación se ha realizado con la finalidad de tratar de abarcar la mayoría de las áreas agrícolas de cada zona algodонера. Estas zonas agrícolas, en su mayoría, cumplen con los requerimientos necesarios de grado de salinidad, tipo de suelo, disponibilidad de agua y nivelación de suelo para poder tener una producción satisfactoria de fibra de algodón al final del ciclo. Como compromiso de la empresa queda declarado que antes de la distribución de la semilla se realizarán reuniones con agricultores para hacer hincapié en las zonas donde se puede y donde no se puede realizar la siembra de algodón, aun cuando se podría conocer por anticipado, que esta actividad solo se realiza en los lugares apropiados para ello.

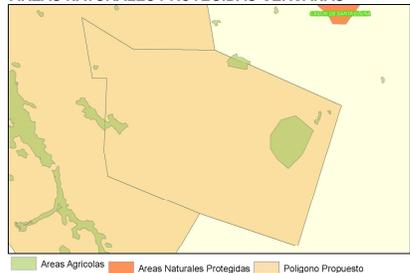


ANEXO: POLIGONO DE LIBERACION PROPUESTO PARA CAMARGO, CHIHUAHUA

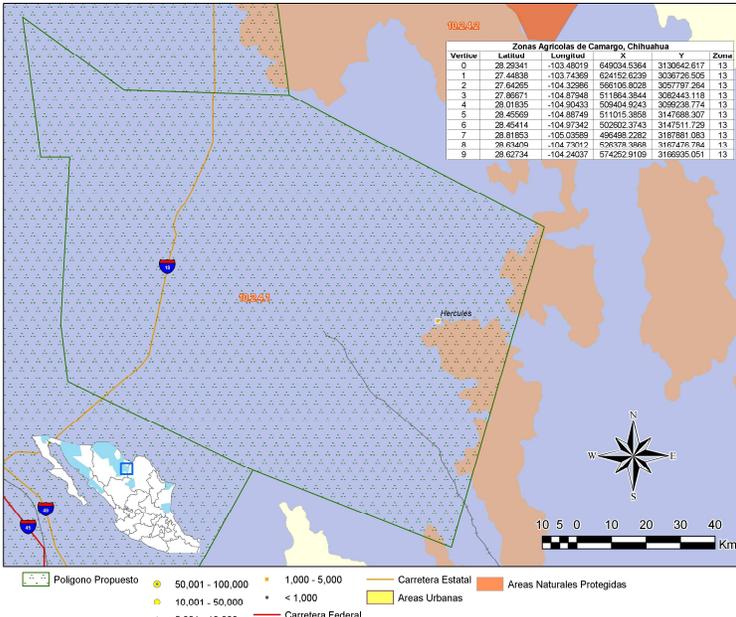
MUNICIPIOS CUBIERTOS



AREAS NATURALES PROTEGIDAS CERCANAS



MAPA GENERAL Y CLAVE DE ECORREGIONES



Nota:

La determinación de los polígonos de liberación se ha realizado con la finalidad de tratar de abarcar la mayoría de las áreas agrícolas de cada zona algodонера. Estas zonas agrícolas, en su mayoría, cumplen con los requerimientos necesarios de grado de salinidad, tipo de suelo, disponibilidad de agua y nivelación de suelo para poder tener una producción satisfactoria de fibra de algodón al final del ciclo. Como compromiso de la empresa queda declarado que antes de la distribución de la semilla se realizarán reuniones con agricultores para hacer hincapié en las zonas donde se puede y donde no se puede realizar la siembra de algodón, aun cuando se podría conocer por anticipado, que esta actividad solo se realiza en los lugares apropiados para ello.



Figura 9. Polígono (seccionado) donde se liberará el algodón B2F en el Estado de Chihuahua (Se anexa mapa con mayor detalle en el CD).



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

II.c.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 las áreas de liberación propuestas y aún cuándo existen al Sur del Estado colectas de algodón *Gossypium barbadense*, este no compatible sexualmente con *G. hirsutum*. 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.

II.c.2 Descripción geográfica

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en las regiones algodoneras del estado de Chihuahua, las cuales incluyen a los municipios de Buenaventura, Ahumada, Coyame del Sotol, Ojinaga, Aldama, Namiquipa, Chihuahua, Aquiles Serdán, Rosales, Camargo, Julimes, Meoqui, Saucillo, La Cruz, San Francisco de Conchos, Sierra Mojada, Jiménez.

Adyacente a estas regiones algodoneras se encuentran las siguientes Áreas Naturales Protegidas: Cumbres de Majalca y Cañón de Santa Elena.

Existe, sin embargo, el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V de no realizar ninguna liberación al ambiente del algodón B2F fuera de los polígonos solicitados y áreas agrícolas actualmente establecidas.

En el mapa anexo del polígono de liberación propuesto para el estado de Chihuahua, se resaltan las áreas naturales protegidas cercanas al polígono propuesto.

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



Figura 10. Mapa con las principales vías de comunicación en el Estado de Chihuahua



III. ESTUDIO DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGMS PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA a los que se refiere el artículo 42, fracción III, de la Ley. Contendrá, además de lo dispuesto en el artículo 62 de la Ley, la información siguiente (Referirse al paquete regulatorio del evento genético combinado Bollgard II®/Solución Faena Flex® (MON 15985 x MON 88913) en algodón, propiedad de la Compañía Monsanto, se anexa carta):

III.a Estabilidad de la modificación genética del OGM

El algodón Bollgard®II contiene una copia completa de los genes transferidos, mismos que se integraron de manera estable al genoma del algodón.

Datos obtenidos de análisis de hibridación Southern indican que todos los elementos genéticos transferidos, incluyendo regiones codificantes, promotores y regiones no codificantes, se encuentran presentes como insertos únicos integrados de manera estable en el algodón Solución Faena Flex® (MON 88913) y de que no se encuentran secuencias del vector no requeridas. El algodón Solución Faena Flex® se ha llevado por 5 generaciones de retrocruzas sin pérdida del fenotipo de tolerancia a glifosato o rearrreglo de los elementos genéticos transferidos. El material genético transferido se hereda siguiendo un patrón Mendeliano para genes únicos y dominantes y los segregantes del material transferido no presentan el fenotipo de tolerancia al herbicida.

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

a) Niveles de expresión de las proteínas Cry1Ac y NPTII en plantas de algodón Bollgard

Las proteínas Cry1Ac y NPTII se producen en bajos niveles (partes por millón o µg/gr) en varios tejidos de la planta de algodón Bollgard®. Los datos generados a partir de muestras recogidas en 1992 se presentan en los cuadros 6 y 7.

Las proteínas Cry1Ac y NPTII se detectaron en el evento 531 y no fueron detectadas, según lo esperado, en la línea parental Coker 312. Los niveles medios de la proteína Cry1Ac en 1992, fueron 1.56 y 0.86 µg/gr peso fresco en hoja y semilla de algodón sin procesar, respectivamente. Los niveles medios de la proteína NPTII en 1992, fueron 3.15 y 2.45 µg/gr peso fresco, para hoja y semilla de algodón sin procesar, respectivamente. Las muestras de varias localidades, en ocho años de ensayos en campo, muestran niveles



medios de la proteína Cry1Ac en semilla de algodón sin procesar que variaron de aproximadamente 1 a 9 µg/gr de peso fresco. En semilla de algodón sin procesar, el nivel medio de la proteína NPTII varió de 2.0 a 15 µg/gr de peso fresco entre las mismas localidades y años de ensayo en campo.

Cuadro 6. Niveles de proteínas Cry1Ac, NPTII y AAD en tejido de hoja de algodón en 1992 (µg/g peso fresco)

Analizado	Coker 312^a	Línea 531 (Bollgard®)^a
Cry1Ac media	ND	1.56
Rango	NA	1.18 - 1.94
error std	NA	0.15
NPTII media	ND	3.15
Rango	NA	2.46 - 3.84
error std	NA	0.270
AAD media	ND	ND
Rango	NA	NA
error std	NA	NA

^a Media de niveles de expresión a lo largo de las localidades de ensayo en campo. N=36.6 muestras por cada una de seis localidades.

ND=no-detectable; NA=no aplicable

Cuadro 7. Niveles de expresión de proteínas Cry1Ac, NPTII y AAD en semilla de algodón en 1992 (µg/g peso fresco)

Analizado	Coker 312^a	Línea 531^a
Cry1Ac media	ND	0.86
rango	NA	0.40 - 1.32
error std	NA	0.18
NPTII media	ND	2.45
rango	NA	1.97 - 2.93
error std	NA	0.19
AAD media	ND	ND
rango	NA	NA
error std	NA	NA

^a Media de niveles de expresión a lo largo de las localidades de ensayo en campo. N=36.6 muestras por cada una de seis localidades.

ND=no-detectable; NA=no aplicable.



La proteína Cry1Ac no fue detectada en néctar recolectado de algodón Bollgard®, utilizando un ensayo con un límite de detección de 1.6 ng/g (0.001 ppm) de peso fresco de néctar. La proteína Cry1Ac está presente en el polen a niveles por encima del límite de detección del ensayo utilizado para evaluar las concentraciones de la proteína Cry1Ac: 11.5 ng/g peso fresco de polen.

Después del procesado, los niveles de proteína Cry1Ac fueron reducidos a niveles no-detectables en la mayoría de los productos procesados de semilla de algodón: aceite refinado, fibras marrones y harina de semilla de algodón. La proteína Cry1Ac no fue detectada por ELISA o bioensayo con insectos, en la harina de semilla de algodón procesada. Se encontró que el contenido de proteína total en el aceite refinado de semilla de algodón estaba por debajo del límite de detección del ensayo (1.3 ppm).

Se analizaron las fibras largas de la semilla de algodón Bollgard® para medir la presencia de la proteína Cry1Ac, utilizando análisis de western blot y bioactividad. La proteína Cry1Ac fue detectada a 0.1 µg/g de peso de fibras sin procesar. Después del procesamiento de las fibras a fibras marrones o a fibras de algodón más purificadas, la proteína Cry1Ac no fue detectada a un límite de detección de 0.08 µg/g de peso.

b) Niveles de expresión de las proteínas Cry2Ab en el algodón Bollgard®II

Se cuantificaron los niveles de las proteínas Cry2Ab en muestras que fueron colectadas de 8 localidades donde se realizaron evaluaciones de prueba durante 1998, mismas que son representativas de las principales regiones algodoneras de los Estados Unidos y presentan una diversidad de condiciones ambientales.

Producción de la proteína Cry2Ab.

Los niveles de la proteína Cry2Ab en hojas jóvenes se mantuvo constante a lo largo de las diferentes evaluaciones y localidades, con valores de 10.1 a 33.3 microgramos/g de peso fresco y con una media a lo largo de las localidades de 23.8 +/- 6.3 microgramos/g peso fresco.



Los niveles de la proteína Cry2Ab en el tejido de la semilla también fue consistente a lo largo de todas las localidades con valores de 31.8 a 50.7 microgramos/g de peso fresco con una media de 43.2 +/- 5.7 microgramos/g peso fresco.

La producción promedio de la proteína Cry2Ab en una planta completa fue de 8.80 +/- 1.2 microgramos/g peso fresco con un rango entre localidades de 7.28 –10.46 microgramos/g de peso fresco. En polen la proteína Cry2Ab no fue detectada por arriba del límite de detección del ensayo (0.25 microgramos/g).

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, no existen la posibilidad de interacción entre los dos tipos de proteínas que pertenecen a vías metabólicas diferentes.

c) Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en el algodón Solución Faena Flex®.

Los niveles de la proteína CP4 EPSPS en el algodón MON 88913 fueron determinados por un método validado de análisis inmunoenzimático ELISA (del inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Los niveles de la proteína CP4 EPSPS en hojas jóvenes, hojas de todo el ciclo, raíces, semillas y polen fueron determinados en tejidos de algodón MON 88913 colectados en ensayos de campo con replicación a través de Estados Unidos durante 2002. Los niveles de proteína CP4 EPSPS para todos los tipos de tejido fueron calculados en microgramos (μg) por gramo (g) de peso fresco. El contenido de humedad se determinó para las hojas jóvenes, hojas de todo el ciclo, raíces y semillas en donde también se calculó en microgramos (μg) por gramo (g) de peso seco. El nivel promedio de proteína CP4 EPSPS en cuatro localidades para hojas jóvenes, hojas de toda el ciclo, raíces y semillas de algodón MON 88913 fue de 970, 1400, 690, 630, 99 y 340 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente. El nivel promedio de proteína CP4 EPSPS en polen en cuatro localidades fue de 4.0 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.



III.c Características del fenotipo del OGM

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen dos copias del gen *epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. El gen *cp4 epsps* codifica una enzima (CP4 EPSPS) que es tolerante a la inhibición por el herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993), y se ha incorporado a las plantas de algodón para conferir tolerancia a las aplicaciones foliares de glifosato. La enzima EPSPS nativa del algodón es susceptible al herbicida glifosato. Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® difieren del algodón Solución Faena® que se comercializa actualmente, que contiene una sola copia del gen *cp4 epsps*, en que la tolerancia a herbicidas agrícolas de la familia Faena es más prolongada. En el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® la aplicación de herbicidas agrícolas de la familia Faena para el control de maleza se puede realizar desde el establecimiento de las plantas de algodón hasta 7 días antes de la cosecha. Por el contrario, si en el algodón Solución Faena® los herbicidas agrícolas de la familia Faena no son aplicados para controlar la maleza por alguna causa, por ejemplo lluvia, cuando la planta llega al estadio de 4ª hoja o 35 días de crecimiento, el herbicida ya no puede ser aplicado sobre el cultivo en estadios de desarrollo posteriores. Por lo tanto el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® tiene la intención de brindar a los agricultores mayor flexibilidad en cuanto a la época de aplicación del herbicida para el control de la maleza.

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

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, no existen características físicas y fenotípicas nuevas que puedan tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y 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

El algodón Bollgard® es sustancialmente equivalente a los algodones convencionales, excepto para las secuencias genéticas insertadas, las proteínas expresadas (proteína Cry1Ac y la enzima neomicinafosfotransferasa) y la capacidad de la planta para resistir el daño de los insectos del orden Lepidóptera.



En las observaciones morfológicas realizadas en campo no se detectaron diferencias morfológicas, de crecimiento o de desarrollo entre el algodón Bollgard® y el Coker 312. Es decir, no se encontraron diferencias en germinación, morfología, tiempo de floración y fructificación, formación y desarrollo de bellotas, y rendimiento. Con respecto a los análisis de calidad de fibra, no se observaron diferencias entre al algodón Bollgard® y el coker 312 en relación al micronaire, longitud, resistencia, elongación y porcentaje de fibra (bajo condiciones en las que se controlaron las plagas en el Coker 312).

No se encontraron diferencias con respecto a la susceptibilidad a las plagas no blanco entre el algodón Bollgard® y el Coker 312, es decir la respuesta del algodón Bollgard® y el Coker 312 fue muy similar a las siguientes plagas tales como la mosquita blanca, gusano soldado, minador de la hoja, chinche Lygus, pulgones y al picudo del algodonoero. Asimismo, no se encontraron diferencias a la susceptibilidad a las enfermedades como Rhizoctonia y Agrobacterium entre el algodón Bollgard® y el Coker 312. Por ultimo, la sobrevivencia de las semillas provenientes del algodón Bollgard® que se queda en el campo después de la cosecha no fue diferente a las semillas provenientes del Coker 312.

Para el **algodón Bollgard® II** se cuantificaron diferentes variables para determinar morfología y madurez, incluyendo: aspecto general de la planta, días a la emergencia, vigor de la planta, conteo de plantas establecidas, relación de altura: nudo, número de días a la primera flor blanca, días a la primera bellota abierta, numero de días al 50% de bellotas abiertas, retención de fruto (el porcentaje del fruto en primera posición retenido en el 95% de la zona), mapeo de planta y días a cosecha. Cualitativamente entre todas las evaluaciones de campo de 1998 y 1999 no se observaron diferencias en apariencia entre el evento 15985 y las plantas usadas como testigo que estuvieran fuera de la variabilidad natural de la variedad DP50. El desarrollo del cultivo, su crecimiento y vigor no fueron diferentes entre el algodón evento 15985 y las plantas usadas como testigo DP50B en ninguna de las localidades evaluadas para las mediciones de la relación altura: nudo, fechas de floración y conteos de bellotas.

En algodón **Solución Faena Flex®**. No se detectaron diferencias en las características fenotípicas entre el MON 88913 y el algodón convencional.

Los datos fenotípicos indican que el MON 88913 no posee ninguna ventaja comparable a otro algodón que tuviera como resultado el de incrementar su potencial de maleza.



Se llevó a cabo una cuidadosa caracterización fenotípica del MON 88913 comparando múltiples características fenotípicas, incluyendo 11 características durante el crecimiento y el desarrollo vegetal, 20 características de mapeo de la planta, cuatro de medidas cápsula/semilla de la planta, 6 características de la calidad de la cápsula y de la fibra, múltiples regímenes de germinación de la semilla, ocho características reproductivas morfológicas y 69 de componentes. Además, se recolectaron datos de observación sobre la presencia y cualquier respuesta diferencial a factores de estrés (plagas y enfermedades) bióticos y abióticos. Estas medidas son bien conocidas por los fitomejoradores del algodón y pueden proporcionar datos suplementarios para determinar las interacciones planta- plaga.

Las conclusiones generales de esta extensa caracterización fenotípica fueron que no existen diferencias biológicas significativas en términos de potencial como plaga entre el MON 88913 y el MON 88913(-) y que la modificación fenotípica del algodón ha sido únicamente con respecto a la tolerancia al herbicida glifosato que se buscaba.

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, no existen diferencias fenotípicas comparado con el algodón 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

Ninguno. El algodón con características de resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al uso de herbicidas tiene una historia larga de uso seguro.

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

Para la detección e identificación del evento MON 88913-8, se ha desarrollado un protocolo de PCR cualitativo en el cual se utilizan los genes insertados y regiones cercanas del DNA de la planta (receptora) como primers, para detección específica.



De la misma manera para la detección e identificación del evento MON 15985-7, se ha desarrollado un protocolo de PCR cualitativo en el cual se utilizan los genes insertados y regiones cercanas del DNA de la planta (receptora) como primers, para detección específica.

Para la detección e identificación del evento apilado Bollgard® II/Solución faena Flex® cualquier de los métodos antes mencionados se puede aplicar.

Los métodos de identificación se describen ampliamente en la referencia anexa que aparece con el nombre de **Compendium of referent methods for GMO analysis**.

También pueden consultarse en el website of the European Food Safety Authority (EFSA) en la siguiente dirección:

http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc_reference_report_2010_11_gmo_analysis_compendium.pdf

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 algodón es muy baja.

III.i Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados

Van Deynze *et al.*, 2005.



IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD A LLEVAR A CABO

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 la cosecha del algodón BG2F. Las actividades incluyen:

- Efectuar una localización georreferenciada de los lotes de los agricultores cooperantes que siembren el algodón BG2F con el propósito de tener un control sobre los sitios de liberación y de esa manera evitar que se siembre en predios no autorizados.
- 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 BG2F. Además, todo el personal involucrado deberá saber que debido a que el algodón BG2F tiene como característica la tolerancia a la aplicación del herbicida Glifosato y resistencia a insectos lepidópteros, es posible detectarlo con facilidad con respecto a otro tipo de algodones.

El plan de capacitación incluye:

Grupo de Capacitación	Responsable de la capacitación	Fecha de la capacitación
Distribuidores y personal regional de Bayer CropScience	Personal de asuntos regulatorios y técnicos de Bayer CropScience BioScience	15-30 marzo de 2012
Técnicos locales	Personal de asuntos regulatorios y técnicos de Bayer CropScience BioScience y Distribuidores y personal regional de Bayer CropScience	1-15 abril de 2012
Agricultores cooperantes	Distribuidores y personal regional de Bayer CropScience y técnicos locales	1-15 abril de 2012



- Proporcionar la asistencia técnica necesaria a los agricultores para un adecuado manejo del cultivo por parte de un investigador o técnico reconocido de la zona.

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).

Los refugios son diseñados caso por caso, considerando la biología del insecto y el sistema de cultivo.

En los refugios se producirán insectos sin historial de selección por las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, mismos que al dispersarse como adultos se cruzarán con insectos que eventualmente fueran seleccionados como resistentes en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.

El requisito del establecimiento de refugios forma parte de las autorizaciones emitidas por la SAGARPA. Los refugios se pueden establecer de acuerdo con una de las siguientes dos alternativas:

Refugio 80:20: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®, 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*.



Refugio 96:4: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bollgard II®/Solución Faena Flex®, 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, metomilo, monocrotofós, sulprofos, thiodicarb, profenofos y piretroides sintéticos (cyflutrina, bifentrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina, lambda cyhalotrina, tralometrina y otros).

La determinación de líneas base de susceptibilidad a las proteínas Bt expresadas en el algodón Bollgard II®/Solución Faena Flex®, y el subsecuente monitoreo de la resistencia son parte integral del plan de manejo de resistencia de plagas.

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

El programa de monitoreo se realizará en las zonas donde se siembre el algodón biotecnológico durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento BG2F y procediendo a su destrucción. Se implementarán las siguientes estrategias:

- Se deberá llevar a cabo un monitoreo voluntario de todos los campos 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 BG2F deberá hacerse monitoreos voluntarios durante un periodo no menor a los 12 meses después de la cosecha o 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 cosecha, mensualmente y cuando se observan plantas voluntarias éstas deberán ser destruidas antes de que floreen, con una aplicación dirigida de glufosinato de amonio o de manera manual. Cuando no se observen voluntarios en dos visitas consecutivas se podrá dejar de visitar ese predio.
- Después de la cosecha se elegirá la mejor ruta que deba seguir el camión que transporta el producto para evitar diseminación de la semilla.
- Celebrar contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y se destine a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial. Cuando el algodón llega a la planta despepitadora, la carga inmediatamente es pesada para saber la cantidad de algodón entregada por cada productor, que debe llegar con un máximo del 11% de humedad, el algodón en este estado se le llama algodón hueso, éste a través de tuberías llega a la desmotadora, las cuales son alimentadas por tornillos sin fin, la maquina desmotadora separa casi completamente la fibra de la semilla, luego la fibra es compactada para formar pacas, de un peso que varia entre los 181.81 y 227.27 Kg., luego se clasifican las fibras de las pacas de acuerdo a la calidad (en base a la elasticidad, grosor y largo de la fibra), el rendimiento para convertir algodón hueso en algodón pluma, anda alrededor del 33%. La semilla está recubierta por una vellosidad llamada borra, la semilla con borra es vendida para consumo animal, cuando la borra es separada de la almendra, la borra es utilizada para la elaboración de colchones, almohadas, etc., y de la almendra se extrae el aceite comestible. El despepite se compromete a destinar la semilla a estos usos y no a su resiembra, almacenamiento, ni comercialización como semilla.



VI.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.

Para monitorear la presencia de plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se utilizan tiras reactivas (QuickStix® Strips) en muestras de hojas. La utilización de tiras reactivas permite, al igual que en el caso de otros cultivos GM, identificar de forma rápida y confiable al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. El método identifica en forma específica las proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 y CP4 EPSPS.

EnviroLogix. QuickStix™ Combo Comb Kit for Cry1Ac/Cry2A/Roundup Ready® AS 046 STC. Catalog Number: AS 046 STC.

Este método está disponible públicamente y puede ser consultado en la siguiente dirección:

http://www.envirologix.com/artman/publish/cat_index_5.shtml

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 o de la cosecha, 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 de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera.

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 BG2F fuera de los predios autorizados. Para ello, se firmarán licencias de uso de la tecnología con agricultores cooperantes. De ser necesario, se efectuará un monitoreo en zonas vecinas a la de liberación del algodón BG2F y se utilizarán tiras reactivas para detectar el evento BG2F en muestras de hojas.



Deberá haber 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.

Se celebrarán contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y sea de este modo destinada a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial

El manejo en campo del algodón BG2F será siempre realizado por personal capacitado y experimentado en el manejo de este tipo de material, incluyendo al agricultor cooperante.

El acceso a los lotes donde se sembrará el algodón BG2F estará restringido solo a personal autorizado por la compañía para tal fin y personal del agricultor cooperante.

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 material una vez que el algodón se encuentra sembrado, 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.
- El camión que transporta la cosecha, en caso de poder elegir entre diferentes rutas de transporte, se elegirán las que se encuentren en mejores condiciones para evitar diseminación.



- Celebrar contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y se destine a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial.
- 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 BG2F y procediendo a su destrucción por medios químicos o manuales.

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 a la Dirección General de Sanidad Vegetal y a las autoridades legales competentes.

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

Las medidas y procedimientos de bioseguridad 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, como resultado de un monitoreo aleatorio de las zonas algodoneras, predios sembrados con algodón BG2F, los cuales no son parte del padrón de agricultores cooperantes, quienes han firmado una licencia de uso de la tecnología de Bayer de México S.A. de C.V., 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 a la Dirección General de Sanidad Vegetal.

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 BG2F está bien caracterizada. Existe el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V. de liberar el algodón BG2F sólo dentro del polígono de liberación propuesto en esta solicitud. Lo anterior se mantendrá controlado con la ubicación de las coordenadas GPS de los predios de los agricultores cooperantes. Además,



se informará de dicha liberación a los agricultores vecinos de los predios en los que se sembrará el algodón BG2F. Todo 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. Análisis de riesgo en países como Australia y los Estados Unidos de América han permitido concluir que el algodón BG2F no posee algún riesgo para el ambiente, ni para la flora o la fauna. El algodón BG2F sólo se distingue de su contraparte convencional por la tolerancia que tiene al herbicida glifosato y resistencia a insectos, atributo conferido por la expresión de las proteínas CP4 EPSPS, Cry1Ac y Cry2Ab, cuya seguridad ha sido ampliamente demostrada.

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

Los agricultores tienen ya establecidos sus canales de comercialización. Por lo tanto, la fibra será comercializada de acuerdo a como lo consideren más adecuado para ellos. Lo mismo sucederá en el caso de la semilla. Como ya se ha mencionado, se firmarán contratos para evitar la desviación de la semilla que resulte en la cosecha del algodón BG2F.

Se celebrarán contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y se destine a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial.

Tal como se menciona anteriormente la cosecha del algodón es procesada en las despepitadoras, donde se hace la separación de la fibra de la semilla con borra.

La semilla está recubierta por una vellosidad llamada borra, la semilla con borra es vendida para consumo animal, cuando la borra es separada de la almendra, la borra es utilizado para la elaboración de colchones, almohadas, etc., y de la almendra se extrae el aceite comestible. El despepite se compromete a destinar la semilla a estos usos y no a su resiembra, almacenamiento, ni comercialización como semilla.

Los residuos de la cosecha del algodón en campo son destruidos por métodos mecánicos. De cualquier manera y como se ha mencionado anteriormente, el algodón sólo se propaga



por medio de la semilla y en cualquier caso se efectuará un monitoreo de plantas voluntarias con el evento BG2F en los ciclos agrícolas subsecuentes.

IV.b.7 Medidas y procedimientos de contingencia, que se llevarán en caso de que ocurra una liberación accidental del OGM

Medidas en caso de una liberación accidental durante el transporte.

- a) En caso de derrame accidental de semilla durante el transporte, la empresa transportadora tendrá indicaciones para que se recoja la semilla derramada y mantengan el material bajo resguardo hasta que Bayer de México S.A. de C.V. sea notificada.
- b) Notificar a todas las personas autorizadas y con capacidad de decisión con relación al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.
- c) Si es posible, hacer todos los esfuerzos por recuperar el material liberado y destruirlo inmediatamente.
- d) Se identifica plenamente el sitio del accidente y se establece 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).
- e) Se debe notificar a la autoridad competente acerca de la liberación accidental.
- f) Se deben documentar exhaustivamente todas las acciones anteriores incluyendo la hora y la fecha de cada acción.
- g) Informar a la autoridad competente sobre el plan de acción que se implementará.

Medidas en caso de una liberación accidental.

- h) Para detectar la dispersión no intencional del OGM más allá de los sitios de liberación permitidos o de las áreas designadas para su uso, se realizan de manera rutinaria las siguientes acciones:
- i) Los predios de algodón serán inspeccionados en un radio de 300 m al final del periodo de siembra en busca de plantas voluntarias con la característica Bollgard II®/Solución Faena Flex® mediante el análisis de plantas con tiras reactivas específicas para detectar las proteínas las proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 y CP4 EPSPS y al ser confirmada se procederá a su eliminación.



- j) Para monitorear la presencia de plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se utilizan tiras reactivas (QuickStix® Strips) en muestras de hojas. La utilización de tiras reactivas permite, al igual que en el caso de otros cultivos GM, identificar de forma rápida y confiable al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. El método identifica en forma específica las proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 y CP4 EPSPS.

EnviroLogix. QuickStix™ Combo Comb Kit for Cry1Ac/Cry2Ab/Roundup Ready® AS 046 STC. Catalog Number: AS 046 STC.

Este método está disponible públicamente y puede ser consultado en la siguiente dirección:

http://www.envirologix.com/artman/publish/cat_index_5.shtml

La cosecha y los residuos de los experimentos de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® serán destruidos en el sitio experimental mediante incineración, al término de las evaluaciones.

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 Bollgard II® y algodón Solución Faena Flex® 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 2004 y la Food and Drug Administration aprobó para consumo humano y animal en 2005 el algodón Solución Faena Flex®, se anexan los documentos de aprobación en la carpeta de referencias.
- En USA, the Animal and Plant Health Inspection Service (US Department of Agriculture) aprobó la siembra comercial del algodón Bollgard II® en 2002, se anexan los documentos de aprobación en la carpeta de referencias ([USDA notification and FDA notification](#)).



- El algodón Roundup Ready Flex®/Bollgard II® es aprobado en el marco actual del sistema de regulación de los EE. UU como un OGM apilado (stacked) ya que este es producto del cruzamiento convencional de dos OGMs que tienen características no vinculadas, y que ya han sido aprobados en esa nación.
- También pueden consultarse directamente en la página Web de dichas oficinas de gobierno de USA.
- En USA the US Department of Agriculture and the Food and Drug Administration aprobaron la siembra comercial y su uso para consumo humano del algodón Roundup Ready® en 1995 y en 2002 para el caso de Bollgard II®.
- En Canadá the Canadian Food Inspection Agency and Health Canada aprobó la liberación comercial y para consumo humano del algodón Roundup Ready® en 1996 y en 2003 el uso de Bollgard II® para livestock y alimentación humana.
- En Japón también se aprobó el algodón Roundup Ready® para liberación comercial en 1997 y para consumo humano y animal en 1998; Bollgard II® se aprobó para consumo humano en 2002 y consumo animal en 2003 por the Japanese Ministries of Agriculture, Forestry and Fisheries, y Health, Labour and Welfare.
- En Filipinas se aprobó el uso del algodón Roundup Ready® para consumo humano y animal en 2003.
- En Argentina se aprobó la liberación comercial del algodón Roundup Ready® en 1999 y para consumo humano y stockfeed en 2000 y 2001, respectivamente.

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

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se obtuvo mediante cruzamiento convencional de los eventos Bollgard®II y Solución Faena Flex® (MON 15985 y MON 88913). La ausencia de cambios en la capacidad competitiva de los eventos de los cuales se deriva el Bollgard®II/Solución Faena Flex®, el diferente mecanismo y ubicación de las proteínas conferidas no sugieren la generación de problemas de maleza o plaga.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® combinan la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ac y Cry2Ab altamente específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodón: 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) (Dankocsik *et al.* 1990; Macintosh *et al.*, 1990; Widner & Whiteley, 1989).

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. Al igual que la toxina Cry1Ac que expresan los algodones Bollgard®, la toxina Cry2Ab controla al gusano bellotero y rosado, sin embargo, estudios realizados por Monsanto han confirmado que existen diferencias en los mecanismos insecticidas de estas proteínas. Las pruebas realizadas *in vitro* e *in planta* indican que la combinación de ambas proteínas incrementa la actividad insecticida observada para cada proteína individual. Este incremento en la actividad insecticida sugiere que estas toxinas actúan de manera aditiva. Existen también diferencias entre las proteínas respecto a su nivel de actividad en las diferentes especies de plagas. La proteína Cry2Ab tiene mayor eficacia contra el gusano bellotero (*H. zea*) y cogollero (*S. frugiperda*) que Cry1Ac, pero esta última es más eficaz contra el gusano tabacalero (*H. virescens*) y rosado (*P. gossypiella*). Por lo anterior, las variedades de algodón Bollgard® II que expresan las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un mejor espectro de control al que ejerce Bollgard® solamente y, por lo tanto, reducen el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo con ambas toxinas.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen dos copias del gen *epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. El gen *cp4 epsps* codifica una enzima (CP4 EPSPS) que es tolerante a la inhibición por el herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993), y se ha incorporado a las plantas de algodón para conferir tolerancia a las aplicaciones foliares de glifosato. La enzima EPSPS nativa del algodón es susceptible al herbicida glifosato.

En las plantas el gen *epsps* nativo (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) codifica para una enzima (EPSPS) crucial en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina), componentes esenciales de las proteínas. Los herbicidas agrícolas de la familia Faena® actúan inhibiendo la actividad de la enzima EPSPS de las plantas, bloqueando la biosíntesis de aminoácidos aromáticos impidiendo así la sobrevivencia de las células vegetales



(Steinrucken & Amrhein 1980). En las plantas genéticamente modificadas que contengan el gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* la biosíntesis de aminoácidos aromáticos no es bloqueada por la presencia de herbicidas agrícolas de la familia Faena y las plantas no mueren cuando se aplica sobre ellas este herbicida.

El herbicida glifosato es usado para el control de un amplio espectro de maleza anual y perenne en aplicación foliar. Este herbicida no tiene actividad residual, ni se lixivia en el perfil del suelo; su molécula es degradada microbiológicamente en productos naturales como agua (H₂O), dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno (N) y fósforo (P) en el término de 60 a 90 días y tiene una baja toxicidad para mamíferos, aves y peces (US EPA, 1993; WHO, 1994; Giesy *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000). Adicionalmente, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos, así como la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en México, han establecido límites máximos de residuos (LMR) para el glifosato de Monsanto en más de 140 cultivos anuales y perennes incluyendo el algodón.

Dado que las proteínas EPSPS se encuentran de forma natural entre plantas y microorganismos de la naturaleza, y que no son tóxicas para peces, aves, insectos, mamíferos y otras especies y que la exposición a estas especies es bastante improbable, debido a sus preferencias alimentarias, no se espera que se produzca ningún efecto adverso sobre la fauna silvestre tras la liberación al ambiente de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. Además, los datos agronómicos y de composición obtenidos del algodón Solución Faena Flex® apoyan la afirmación de que el impacto sobre la biodiversidad del algodón modificado será equivalente al del algodón convencional.

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

Como se describe en el inciso anterior, el análisis efectuado en los Estados Unidos de América ha concluido que la liberación del algodón BG2F no representa riesgo alguno para el ambiente, ni para la flora o la fauna.



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

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).

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).

Cuadro 8. Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados

	% of total reduction in environmental impact: developed countries	% of total reduction in environmental impact: developing countries
GM HT soybeans	53	47
GM IR maize	92	8
GM HT maize	99	1
GM IR cotton	15	85
GM HT cotton	99	1
GM HT canola	100	0
Total	46	54
Developing countries include all countries in South America		

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.



La adopción de algodón biotecnológico en el mundo durante 2006 alcanzó una superficie total de 13.4 millones de hectáreas equivalente al 38% del área global destinada a este cultivo, en donde sobresalen por su superficie sembrada los países de la India, Estados Unidos, Argentina y China (James, 2006). En el caso de México la adopción de algodón biotecnológico alcanzó las 54,750 ha, lo que representó el 46% de la superficie total destinada al cultivo durante 2006 sobresaliendo las regiones de la Comarca Lagunera y Chihuahua.

En el caso de México, se cuenta con la información generada de la evaluación agronómica de las variedades de algodón Bollgard® durante el periodo 1996-2006. La información acumulada en este periodo indica que se ha obtenido una reducción importante en el uso de insecticidas para la producción de algodón de al menos 454,000 L de producto formulado. La reducción en las aplicaciones de insecticidas contribuye a disminuir su efecto negativo en las poblaciones de insectos benéficos y otros organismos no blanco.

En el estudio de Traxler y Godoy-Ávila (2004) realizado en La Laguna se analizaron los aspectos económicos y ambientales de la tecnología Bollgard® en nuestro país. Los resultados del estudio indican que el algodón Bollgard® es una importante herramienta para la producción de algodón contribuyendo a la reducción en el uso de insecticidas al menos en un 50% con relación al algodón convencional y generando importantes beneficios económicos para los agricultores. En este estudio los investigadores determinaron que aproximadamente el 85% de los beneficios generados por la utilización de la tecnología fueron para los agricultores.

Los agricultores que utilizaron la tecnología Bollgard® han obtenido un beneficio económico promedio de \$2,950/ha superior al obtenido por los agricultores que sembraron algodón convencional. El algodón Bollgard® ha contribuido a elevar la competitividad del cultivo en México y ha disminuido el riesgo de fallas en el cultivo por el ataque de insectos. Adicionalmente, el uso de la tecnología Bollgard® ha contribuido significativamente al éxito de la campaña binacional México-Estados Unidos para la erradicación del gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders) (Traxler y Godoy-Ávila, 2004).

Los resultados reportados en el estudio de Traxler y Godoy-Ávila (2004) son consistentes con los obtenidos en otras regiones algodonerías del mundo. En Argentina, Qaim y de Janvry (2003) reportan una reducción en las aplicaciones de insecticidas de 50% con relación al algodón



convencional, principalmente de insecticidas altamente tóxicos, con el beneficio correspondiente para el ambiente y la salud de los agricultores. Adicionalmente los agricultores que adoptaron la tecnología Bollgard® obtuvieron un rendimiento significativamente superior al obtenido en algodón convencional. La estimación econométrica realizada demuestra que se necesitarían duplicar las aplicaciones de insecticidas en algodón convencional para poder alcanzar los niveles de rendimiento por hectárea obtenidos en el algodón Bollgard®.

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

Se anexa a la presente solicitud y en la carpeta de referencias una copia de la notificación del USDA en la que se determina que el algodón B2F no es ya un evento regulado

- [Non-regulated status for Roundup Ready Flex Cotton](#)
- [Non-regulated status for Bollgard II Cotton](#)

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

Manejo de Malezas

Las especies de maleza que se presentan en el cultivo de algodón compiten por los escasos recursos de nutrientes, luz y espacio, y por lo general, se adaptan mejor a las condiciones de crecimiento existentes que el cultivo plantado.

El algodón, frente a las malas hierbas tiene muchas desventajas como especie agronómica: 1) su establecimiento es más lento que muchas especies de maleza; 2) depende en mayor grado de temperaturas óptimas del suelo (27 a 32°C) para una rápida germinación; y 3) utiliza el agua, los nutrientes y la energía con menos eficacia que muchas de las malezas llamadas C₄ (Frisbie y El-Zik, 1989).



Ante tales situaciones, el algodón es un mal competidor de las malezas, y este bajo grado de competitividad se agrava a menudo por su elevada susceptibilidad a las enfermedades y al ataque de insectos.

En la mayoría de los casos, los productores de algodón se resisten a usar herbicidas para el control de malezas debido tanto al desconocimiento que de estos productos se tiene, como al riesgo que su uso representa; por ello, la siembra de variedades que escapen al daño de herbicidas puede ser una excelente herramienta que elimine el riesgo de daño al cultivo.

Las principales malezas que atacan al cultivo de algodón en todo el mundo forman un grupo de 32 especies correspondientes a 14 familias (Frisbie y El-Zik, 1989).

El algodón es muy susceptible a la competencia de las malezas y casi el 30% de la producción mundial se pierde debido a sus efectos adversos. Si el cultivo no se desyerba regularmente las pérdidas pueden alcanzar hasta un 90% (Beltrao *et al.*, 1974).

El algodón, como todas las plantas, no se ve afectado por la competencia de la maleza mientras las plántulas dependen del suministro del endospermo, pero una vez agotado éste, la competencia puede ser severa generalmente durante seis a ocho semanas (Frisbie y El-Zik, 1989). En la Comarca Lagunera es necesario mantener el cultivo libre de malas hierbas hasta los 60 o 70 días después de nacido (SAGAR-INIA, 1980), mientras que en la región agrícola del Estado de Chihuahua el período crítico de competencia comprende entre los 30 y 75 días después de la emergencia del cultivo (SARH, 1984). Lo anterior indica que durante dicho período debe ponerse especial atención al manejo de malas hierbas, ya que de no hacerlo se ven reducidos drásticamente los rendimientos. Pasando este período, y una vez que el terreno es cubierto completamente por una bóveda vegetal de plantas vigorosas, el algodón puede llegar a ser un fuerte competidor, en especial en lo que se refiere a la humedad, y es menos afectado por el crecimiento de las malas hierbas. En esta etapa, el control de las plagas de insectos y de las enfermedades puede llegar a ser un problema más importante que el control de las malas hierbas.

Por su parte, los daños indirectos se refieren a aquellos daños que no afectan directamente la expresión del rendimiento, pero que de alguna manera incrementan la posibilidad de que otro



problema del manejo del cultivo se haga presente. Los daños indirectos más importantes incluyen dificultad en la cosecha, baja calidad de la fibra debido al manchado y contenido de basura en la misma, y fuentes de reservorio de insectos plaga y patógenos causantes de muchas enfermedades en el cultivo.

Algunas malezas que hospedan organismos dañinos al algodón incluyen a *Sida* spp. como hospedante de virus; *Amaranthus* spp hospeda a *Rhizoctonia*, uno de los principales agentes de la podredumbre de plántulas; *Solanum eleagnifolium*, *S. carolinense*, *Sida spinosa*, *Abutilon theophrasti*, *Portulaca oleracea*, *Ipomoea purpurea* y *Amaranthus retroflexus* albergan los hongos *Verticillium albo-atrum* y *Phymatotrichum omnivorum*. *Solanum eleagnifolium*, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus retroflexus* y *Datura stramonium* mas otras malezas, son hospedantes del nemátodo de la podredumbre de la raíz *Meloidogine incognita* (Frisbie y El-Zik, 1989).

Otras malezas son hospedantes de plagas de insectos: *Abutilum asiaticum* es hospedante de *Earias insulana* en Madagascar; *Malachrae* spp y otras hierbas malváceas son hospedantes de *Dysdercus* spp; *Amaranthus* spp, *Physallis peruviana*, *Portulaca oleracea*, *Nicandra physaloides*, *Eleusine indica*, *Emilista tora* y *Sida* spp. son hospedantes de *Spodoptera frugiperda*, *Prodenia sunia* y *Prorachia daria* en el Perú y Colombia; *Hibiscus rosa-sinensis* es hospedante de *Anthonomus vestitus*; siete de las malezas latifoliadas enumeradas albergan el *Heliiothis* en los Estados Unidos, y la *Ipomoea cordofana* alberga a *Bemisia tabaci* en Sudán. *Pseudatomoscelis seriatus* depende en Texas y Oklahoma de una serie de hospedantes, viviendo en la primavera en distintas malezas para después emigrar hacia el algodón, y cuando éste ha madurado, la pulguilla saltona se transfiere a *Croton* spp y otras malezas (Frisbie y El-Zik, 1989).

Para contender con dichos problemas se cuenta con métodos de control.

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.

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 algodónero (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 debe programarse a intervalos entre 14 y 18 días después del brote (Philips and Timmons 1954, citados por Muzik, 1970; NAS, 1980).

Control manual. Consiste en la utilización del azadón para controlar la maleza que se desarrolla entre las plantas de algodónero, 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.



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 mallas 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)

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.

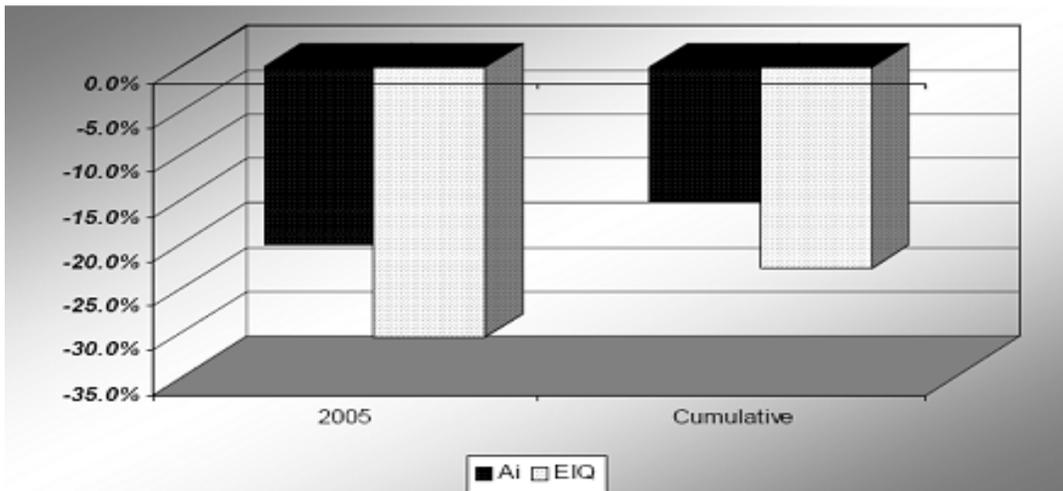
Existen varias formas de clasificar los herbicidas, incluyendo como se usan, sus propiedades químicas y su modo de acción (FAO, 1996).

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).

Lo anterior describe algunas consideraciones sobre el uso de las alternativas disponibles para contender con el problema del manejo de maleza en el cultivo del algodón. Sin embargo, al no usar las tecnologías disponibles como lo es la siembra de cultivos GM como el algodón BG2F, se está perdiendo varios beneficios como se muestra a continuación.



Cuadro 9. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a los herbicidas en los EE.UU., Australia y Sudáfrica de 1997-2005.

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 EE. UU., Australia y Sudáfrica del año 1997 a 2005.

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.

Cuadro 10. Consumo de combustible por el uso del tractor, por método de labranza

	litre/ha
Traditional cultivation: moldboard plough, disc and seed planting etc	46.65
Conservation cultivation (RT): chisel plough, disc and seed planting	28.83
No-till (fertiliser knife, seed planting plus 2 sprays: pre-plant burn down and post-emergent)	14.12

Source: Adapted from Jasa (2002) and CTIC 2004



En el siguiente cuadro 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.

Cuadro 11. Impacto de cambios en el uso de herbicidas e insecticidas por la cultivación global de los cultivos GM de 1996 a 2005

Trait	Change in volume of active ingredient used (million kg)	Change in field EIQ impact (in terms of million field EIQ/ha units)	% change in ai use in GM growing countries	% change in environmental impact in GM growing countries
GM herbicide tolerant soybeans	-51.4	-4,865	-4.1	-20.0
GM herbicide tolerant maize	-36.5	-845	-3.4	-4.0
GM herbicide tolerant cotton	-28.6	-1,166	-15.1	-22.7
GM herbicide tolerant canola	-6.3	-310	-11.1	-22.6
GM insect resistant maize	-7.0	-403	-4.1	-4.6
GM insect resistant cotton	-94.5	-4,670	-19.4	-24.3
Total	-224.3	-12,259	-6.9	-15.3

Manejo de plagas

Entre las principales plagas lepidópteras del algodónero se encuentran el complejo bellotero (*Heliiothis 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 precomercial 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® es totalmente compatible con los principios del manejo integrado de plagas (MIP), debido a que Bollgard® controla únicamente algunos insectos lepidópteros, por lo cual muchos insectos benéficos además de no ser afectados por la tecnología Bollgard® son beneficiados por la reducción en el uso de plaguicidas en el cultivo.

El algodón Bollgard®II evento 15985, resistente al ataque de insectos plaga, fue desarrollado a partir del algodón genéticamente modificado (GM) línea 531 que expresa la proteína *Bt* Cry1Ac. La planta de algodón 531 fue modificada genéticamente para producir una segunda proteína *Bt* con actividad insecticida frente a importantes plagas del algodón. La nueva proteína insecticida (Cry2Ab) es miembro de una familia de proteínas producidas por la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*). Las cepas de *Btk* se emplean extensivamente como bioplaguicidas en diferentes cultivos. Estas proteínas se denominan comúnmente como proteínas *Bt*, y el algodón Bollgard®II evento 15985 produce dos proteínas *Bt*, la Cry1Ac y la Cry2Ab.

La presencia en 15985 de un segundo gen *Bt* le confiere protección adicional frente a insectos plaga. Estas dos proteínas insecticidas poseen un modo de acción similar, pero interactúan con diferentes sitios receptores en el intestino de los insectos blanco, permitiendo así contar con dos líneas de protección frente al ataque de insectos plaga. La expresión de más de una proteína *Bt* en la misma planta es una estrategia útil para reducir la probabilidad de seleccionar individuos resistentes en las poblaciones de los insectos blanco.

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® es totalmente compatible con los principios del manejo integrado de plagas y debido a que controla en forma específica algunos insectos lepidópteros su utilización representa para insectos benéficos que no son blanco de la tecnología obtener el beneficio por la reducción en la aplicación de plaguicidas requeridos para la producción de algodón.

**Cuadro 12. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodónero (CICOPLAFEST, 1998; SAGAR, 2000; PLM, 2006).**

Ingrediente Activo	Categoría Toxicológica	Grupo Químico
Acefate	Ligeramente tóxico	Organofosforado
Azinfos metílico	Altamente tóxico	Organofosforado
Betaciflutyn	Ligeramente tóxico	Piretroide
Bifentrina	Ligeramente tóxico	Piretroide
Carbarilo	Moderadamente tóxico	Carbamato
Cipermetrina	Moderadamente tóxico	Piretroide
Clorfenapir	Ligeramente tóxico	Halogenado de 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
Metomilo	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

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® combinan la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ac y Cry2Ab altamente específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodónero: 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) (Dankocsik *et al.* 1990; Macintosh *et al.*, 1990; Widner & Whiteley, 1989).

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. Al igual que la toxina Cry1Ac que expresan los algodones Bollgard®, la toxina Cry2Ab controla al gusano bellotero y rosado, sin embargo, estudios realizados por Monsanto han confirmado que existen diferencias en los mecanismos insecticidas de estas proteínas. Las pruebas realizadas *in vitro* e *in planta* indican que la combinación de ambas proteínas incrementa la actividad insecticida observada para cada proteína individual. Este incremento en la actividad insecticida sugiere que estas toxinas actúan de manera aditiva. Existen también diferencias entre las proteínas respecto a su nivel de actividad en las diferentes especies de plagas. La proteína Cry2Ab tiene mayor eficacia contra el gusano bellotero (*H. zea*) y cogollero (*S. frugiperda*) que Cry1Ac, pero esta última es más eficaz contra el gusano tabacalero (*H. virescens*) y rosado (*P. gossypiella*). Por lo anterior, las variedades de algodón Bollgard® II que expresan las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un mejor espectro de control al que ejerce Bollgard® solamente y, por lo tanto, reducen el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo con ambas toxinas.

Esta tecnología es compatible con el manejo integrado de plagas y reduce significativamente el uso de insecticidas contra los insectos blanco. La siembra de variedades Bollgard®II/Solución Faena Flex® exige la implementación de un programa para el manejo de la resistencia en las poblaciones de insectos blanco basado en la siembra de algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis* como áreas de refugio. En los refugios se producirán insectos sin historial de selección por las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, mismos que al dispersarse como adultos se cruzarán con insectos que eventualmente fueran seleccionados como resistentes en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. El monitoreo de la resistencia tiene como objetivo conocer su eventual evolución y tomar a tiempo decisiones sobre el manejo del cultivo, a fin de preservar el valor y los beneficios económicos y ambientales de la tecnología Bollgard®II/Solución Faena Flex®.



Es importante tener en cuenta que los insectos son capaces de adaptarse y generar resistencia a los insecticidas. El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® no está exento de esa posibilidad por lo que para usar esta tecnología se debe dejar una porción de su superficie con algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis* que servirá como área de refugio.

Por lo que el refugio sirve para que en este algodón se produzcan insectos que no han tenido contacto con Bollgard®II/Solución Faena Flex® y que diluyan cualquier posible resistencia al cruzarse con insectos que hayan sido seleccionados en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®; los refugios sirven también como reservas naturales de insectos susceptibles para asegurar que Bollgard®II/Solución Faena Flex® mantenga su efectividad por muchos años.

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 Cry1Ac y Cry2Ab, mismos que al dispersarse como adultos se cruzarán con insectos que eventualmente fueran seleccionados como resistentes en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.

La SAGARPA recomienda un refugio 80:20: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®, 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 Bollgard®II/Solución Faena Flex®, 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,



metomilo, 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.

El algodón Bollgard® que produce la proteína Cry1Ac se ha cultivado empleando como enfoque para el MRI la incorporación de refugios en las áreas de cultivo. En la actualidad ya se cuenta con líneas de algodón que expresan Cry2Ab, así como variedades que expresan tanto la proteína tipo Cry1Ac como la Cry2Ab.

El valor de dos proteínas insecticidas con mecanismos de acción diferentes.

La introducción de dos proteínas insecticidas con diferente mecanismo de acción para propósitos del MRI a fin de incrementar el desempeño de los cultivos no es una idea nueva. La mezcla de insecticidas convencionales, por la misma razón, se ha realizado por más de 20 años, y



estrategias similares se han empleado con herbicidas para el manejo de la resistencia en malezas. Intuitivamente parece razonable que tal estrategia permita retrasar el desarrollo de resistencia si los insectos blanco no pueden desarrollar un mecanismo que combata ambas toxinas simultáneamente. Estudios teóricos y empíricos han demostrado sin embargo que esta estrategia trabaja solamente si se cumplen ciertas condiciones (Tabashnik, 1989; Roush 1994).

Mediante modelos matemáticos Roush (1994; 1997) demostró que las mezclas de toxinas pueden retrasar de manera efectiva la aparición de resistencia a las toxinas individuales siempre que la mortalidad relativa del insecto susceptible sea mayor con dicha mezcla que la ocasionada por cada toxina individual y el carácter de resistencia sea recesivo. Para cultivos transgénicos, la estrategia más efectiva es aquella en la que ambas proteínas se expresan dentro de un mismo producto (efecto pirámide).

Para trasladar a la práctica agrícola la estrategia del uso de dos proteínas insecticidas es importante saber si las suposiciones en torno a la actividad insecticida de las toxinas individuales y la genética de la resistencia se cumplen.

La demostración de que ambas toxinas son altamente eficaces contra las plagas blanco es relativamente sencilla, y en algodón Bollgard® (Cry1Ac) se ha cumplido con este criterio respecto de la proteína Bt que se expresa. La evidencia en torno a la genética de la resistencia es necesariamente menos clara debido a la ausencia de casos de resistencia en campo a los cultivos transgénicos. La evidencia inferida de los trabajos realizados en colonias de insectos resistentes generadas a través de la combinación de selección en laboratorio y campo, sugiere que la resistencia a las proteínas Bt expresadas en cultivos transgénicos será recesiva o altamente recesiva en la naturaleza. Estudios en tres especies de lepidópteros muy diferentes entre sí apoyan esta conclusión (gusano bellotero, *Heliothis virescens*- Gould *et al.*, 1995; palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella*- Tabashnik *et al.*, 1997; y el gusano rosado *Pectinophora gossypiella*- Liu *et al.*, 1999).

Los resultados de estos modelos también dependen del grado de resistencia cruzada entre toxinas. A mayor grado de cruzamiento en la resistencia se reduce el valor del manejo de la resistencia mediante la introducción de la segunda toxina. Estudios empíricos de resistencia a



Bacillus thuringiensis indican niveles bajos pero variables, de resistencia cruzada entre proteínas Bt's estrechamente relacionadas (Gould *et al.*, 1995).

El trabajo de Kota (1999) demostró el uso de proteínas insecticidas con mecanismos nuevos en plantas de tabaco. La expresión de Cry1C en brócoli transgénico ha permitido el control de la palomilla dorso de diamante resistente a Cry1Ac (Cao *et al.* 1999).

Dando el peso relativo de estudios teóricos y la evidencia empírica es claro el valor de utilizar proteínas con diferentes propiedades insecticidas para el MRI.

VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O SE DESTINE A LA BIORREMEDIACIÓN. En caso de no contar con la autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente anexa a un escrito libre, en el que se indique el número de autorización;

El evento genético combinado Bollgard II® / solución Faena Flex® (MON-15985-7 X MON-88913-8) cuenta con la formal autorización No. COFEPRIS / CEMAR / 083300COO42332 / 2008 de fecha 22 de julio del 2008, expedida por la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

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

Se solicita el permiso para un año, tiempo que incluye desde la planeación de los estudios a realizar, importación de la semilla hasta la cosecha.



A. REFERENCIAS

Adang, M.J., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F. and Thompson, D.V. 1985. "Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*", *Gene* 36:289-300.

Anderson, K.S., and K.A. Johnson. 1990. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: Lessons from EPSP synthase. *Chem. Rev.* 90:1131-1149.

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.

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2000. GM Foods and the Consumer. Australia New Zealand Food Authority's Safety Assessment Process for Genetically Modified Foods. http://www.anzfa.gov.au/documents/pub02_00.pdf

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2001a. The Food Standards Code, Vol. 2, Standard 3.2.2; Food Safety Practices and General Requirements (Australia only). <http://www.anzfa.gov.au/foodstandards/foodstandardscodecontents/standard32.cfm>.

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2001b. Food safety: the priority classification system for food business. Lkd. <http://www.anzfa.gov.au/mediareleasespublications/publications/index.cfm>.

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2002. Draft assessment report (Full assessment - S.15) Application A436: Oil and linters derived from insect-protected cotton containing event 15985, Australia New Zealand Food Authority, Canberra, Australia, Full assessment - S.15 Application A436.

Baker, H. G., 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. *In*: H. G. Baker & G. L. Stebbins (eds.), *The Genetics of Colonizing Species*. Academic Press, New York, pp. 147-172.



Baker, J., Johnson, H. 1979. The Effect of Tillage Systems on Pesticides in Runoff from Small Watersheds. Transactions of the ASAE: 554-559.

Bairoch, A. and B. Boeckmann. 1993. "The SWISS-PROT Protein Sequence Data Bank, Recent Developments." Nucl. Acids Res. 21:3093-3096.

Bartlett, S. G., Grossman, A. R., & Chua, N. H. 1982, Methods in chloroplast molecular biology Elsevier, Amsterdam.

Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B & Schaller H (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 9: 327–336.

Benson, D., D. J. Lipman, and J. Ostell. 1993. "GenBank". Nucl. Acids Res. 21:2963-2965.

Berberich, S.A., J.E. Ream, T.L. Jackson, R. Wood, R. Stipanovic, P. Harvey, S. Patzer, and R.L. Fuchs. 1996. The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional Cottonseed. J. Agri. Food Chem. 44:365-371.

Bergmans, H. (1993). Acceptability of the use of antibiotic resistance genes as marker genes in transgenic plants. P. 106-108. In: OECD Report on the Scientific Approaches for the Assessment of Research Trials with Genetically Modified Plants. April 6-7, 1992. Jouy-en-Josas.

Bertolla, F. & Simonet, P. (1999). Horizontal gene transfer in the environment: Natural transformation as a putative process for gene transfer between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* **150**, 375-384.

Betz, F. S., Hammond, B. G. and Fuchs, R. L. 2000. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Protected Plants to Control Insect Pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32: 156-173.

Blum, S.A.E., Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1997). Mechanisms of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in non-sterile soil. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 513-521.



Brookes, Graham & Peter Barfoot. 2005. GM Crops: The Global Economic and Environmental Impact—The First Nine Years 1996–2004. *AgBioForum*, 8(2&3): 187-196.

Canadian Food and Inspection Agency. 1997. Decision Document 97-21: Determination of the Safety of Cotton Lines With Roundup Ready™ Genes (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Health and Production Division, Plant Biosafety Office.

Carpenter, J. E., & Gianessi, L.P. 2001. Agricultural biotechnology: Updated benefits estimates. Washington, DC: National Center for Food and Agricultural Policy.

Carpenter, J.E.; Felsot, Allan; Timothy Goode; Michael Hammig; David Onstad; Sujatha Sankula. 2002. Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops Council for Agricultural Science and Technology. Printed in the United States of America

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

Carter JN and Liggett MP. 1994. Acute oral toxicity and infectivity/pathogenicity to rats of EG 7841. Report No. HRC Study Report number ECO 6/942538, Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon Cambridgeshire England.

Cho, Y., Qiu, Y.L., Kuhlman, P. & Palmer, J.D. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14244-9.

Crecchio C, Stotzky G (1998) Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 463-470.

Crickmore, N., D.R. Ziegler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum and Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 807-813.



Culpepper, Alfred S.; York, Alan C. 2000. Weed Management In Glyphosate-tolerant Cotton. *The Journal of Cotton Science*(4):174 - 185.

Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. & Lee, S.B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnol.* **16**, 345-348.

Dankocsik, C., Donovan, W.P. and Jany, C.S. 1990. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *J. Mol. Microbiol.* 4 (12), 2087-2094.

Davies, J. E. & Benveniste, R. E. 1974, "Enzymes that inactivate antibiotics in transit to their targets", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 235, no. 0, pp. 130-136.

Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42: 73-91.

Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T., & Kishore, G. M. 1986. "Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 18, pp. 6873-6977.

Diggle A, Neve P & Smith FP. 2003. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance. *Weed Research*, 43(5), 371-382.

Droge, J., Puhler, A. & Selbitschka, W. (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology* **64**, 75-90.

e-CFR (Electronic Code of Federal Regulations). Title 7 - Agriculture. Subtitle B - Regulations of the Department of Agriculture. Chapter I - Agricultural Marketing Service (Standards, Inspections, Marketing Practices), Department of Agriculture. Subchapter K - Federal Seed Act. Part 201 Federal Seed Act Regulations.



English, L. and S. L. Slatin. 1992. The mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22:1-7.

EPA (US Environmental Protection Agency). 1994. Plant-pesticides; Proposed Exemption From the Requirement of a Tolerance Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic. 59 Fed. Reg. 60535.

Environmental Protection Agency (EPA) 1998. Registration Eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis* (Bt). EPA 738-R-98-004.

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.

Estes, T. L., Allen, R., Jones, R. L., Buckler, D. R., Carr, K. H., Gustafson, D. I., Gustin, C., McKee, M. J., Hornsby, A.G., & Richards, R. P. 2001. Predicted impact of transgenic crops on water quality and related ecosystems in vulnerable watersheds in the United States. Paper presented at the Soil and Water Mini-Symposium, British Crop Protection Council (BCPC) Conference, Weeds 2001. Brighton, UK.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 1995. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies, Rome, Italy, November 13-14, 1995. FAO, Rome.

FAO/WHO 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology, 29 May - 2 June 2000.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization). 2001. Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology 22 – 25 January 2001. Rome, Italy.

Fast, PG. 1981 The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges HD ed. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. New York, London, Academic Press Inc., pp 223-248.



FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Federal Register 57(104):22984-23005.

FDA (Food and Drug Administration). 1994a. Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption; Food Additives Permitted in Feed and Drinking Water of Animals; Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase II. 59 Fed. Reg. 26700.

FDA (Food and Drug Administration). 1998. Guidance for Industry: Use of Antibiotic Resistance Marker Genes in Transgenic Plants (Draft Guidance). Docket No. 98D-0340. [Online]. Available: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html> [1999, December 2].

Felsot, A. S. 2000b, "Insecticidal genes. Part 2: Human health hoopla", Agrichemical and environmental news, vol. 168, pp. 1-7.

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

Flavell, R.B., Dart, E., Fuchs, R.L. and Fraley, R.T. 1992. Selectable marker genes are safe for plants?. Bio/Technology 10:141-144.

Fraley, R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Ho&arm, and S. C. Woo. 1983. Expression of Bacterial genes in Plant Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807.

Fryxell, P. A. 1979. The Natural History of the Cotton Tribe (Malvaceae, Tribe Gossypieae). Texas A&M University Press. College Station and London. 245 pp.

Fryxell, P. A. 1984. Taxonomy and Germplasm Resources. pp. 27-57. In Kohel, R. J. and Lewis, C. F., Editors. Cotton. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. 605 pp.

Fryxell, P.A., 1992. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). Rheedea 2: 108-165.



Fuchs, R. L.; Berberich, S. A.; Serdy, F. S. 1993. Safety evaluation of genetically engineered plants and plant products: Insect resistant cotton. In *Biotechnology and Safety Assessment*; edited by John A. Thomas and Laurie Myers. Raven Press, Ltd., New York, pp. 199-212.

Fuchs, R.L. 1994. "Gene Expression and Compositional Analysis from Field-Grown Insect Resistant Cotton Tissues" (1994), Study Number 92-01-36-07, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID#43168701.

Fuchs, R. L. and Astwood, J.D. 1996. Allergenicity Assessment of Foods Derived from Genetically Modified Plants (1). In *Highlights in Food Allergy* (B. Wüthrich B. Ortolani, eds) S. Karger AG, Monographs in Allergy; 1996, Vol. 32, 105 -120) *Food Technology*, Feb. 1996, 83-88.

Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Canto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C. & Stotzky, G. (1994). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**, 119-126.

Gebhard, F. & Smalla, K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**,261-272.

Gianessi, L.P. 2005. Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 61:241-245.

Giesy, John P.; Stuart Dobson, and Keith R. Solomon. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol* 167:35-120.

Gould, F., Anderson, A., Reynolds, A., Bumgarner, L. and Moar, W. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88: 1545-1559.

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

Greaves, M.P. & Wilson, M.J. (1970). The degradation of nucleicacids and montmorillonite-nucleic acid complexes by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **2**, 257-268.

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.

Harrison, L. A., M. R. Bailey, N. W. Naylor, J. E. Ream, B. G. Hammond, D. Nida, B. L. Burnetter, T. E. Nickson, T. A. Mitsky, M. L. Taylor, R. L. Fuchs, and S. R.

<http://www.agbios.com>

Padgett. 1993. The expressed protein in glyphosatetolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.* 126(3):728-740.

Hebblethwaite, J. F. 1995. The contribution of no-till to sustainable and environmentally beneficial crop production. A global perspective. Conservation Technology Information Center, West Lafayette, Indiana.

Hernández, J.; Pacheco Covarrubias, J.; Ortíz Enriquez, J.E.; Uvalle Bueno, J.X.; Tamayo Esquer, L.M.; Contreras de la Cruz, E. 1996. Recomendaciones para el cultivo del algodón en el Estado de Chihuahua ciclo primavera - verano 1996. Campo Experimental Valle del Yaqui. INIFAP. Cd. Obregón, Son.

Hofmann, C., Vanderbruggen, H.V., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., and Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7844-7848.



Hooykaas, P.J.J. and Shilperoort, R.A. 1992. Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19: 15-38.

Infojardin: <http://www.infojardin.com/fichas/hortalizas-verdes>

International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/15010006.htm>

Jain, R., Rivera, M.C. & Lake, J.A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3801-3806.

James, C. 2006. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.

Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment. Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for MON15985 x MON88913

Jefferson, R. A., Burges, S.M., and Hirsh, D. 1986. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:8447-8451.

John, M.E., 1997. Cotton crop improvement through genetic engineering- In *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(31): 185-208

Kay, R., A C&an, M. Daly, and J. McPherson. 1987. Duplication of the CaMV 35s Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science* 236: 1299-1302.

Kay, B. D. 1995. Soil quality: Impact of tillage on the structure and tilth of soil. Pp.7–9. *Farming for a Better Environment*. Soil and Water Conservation Society, Ankeny, Iowa.

Keeling, J. W., Dotray, P. A., Osborn, T. S., Asher, B. S. 1998. Postemergence Weed Management With Roundup Ultra, Buctril And Stable In Texas High Plains Cotton. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. 1. 861 - 862.



Keeling, J. W., P. A. Dotray, T. S. Osborne, and J. D. Everitt. 2000. Weed management in Roundup Ready (glyphosate-tolerant) cotton: Conventional and conservation tillage systems. Proc Beltwide Cotton Conf 2:1477.

Kern, J. S. and M. G. Johnson. 1993. Conservation tillage impacts on national soil and atmospheric carbon levels. Soil Sci Soc Am J 57:200–210.

Klee, H. J., Muskopf, Y. M., & Gasser, C. S. 1987, "Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants", Molecular and General Genetics, vol. 210, no. 3, pp. 437-442.

Knowles, B.H. , Dow, J.A.T. 1993. The crystal d-endotoxins of Bacillus thuringiensis: models for their mechanism of action on the insect gut. Bioessays 15: 469-476.

Kolwyck, D., K. Hamilton, and R. Lirette. 2000. Protein levels in insect-protected cotton samples produced in the 1999 US field trials. Monsanto research report: MSL-16724.

Koskella J, Stotzky G (1997) Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. Applied and Environmental Microbiology 63: 3561-3568.

Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S.F., Gould, F. and Moar W.J. 1999. Overexpression of the Bacillus thuringiensis (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistance insects. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 1840-1845.

Lee, M.K., Young, B.A. and Dean, D.H. 1995. Domain III exchanges of Bacillus thuringiensis Cry1A toxins effect binding to different gypsy moth midgut receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216: 306-312.

Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvyl shikimate 5-phosphate. J. Biol. Chem. 239:1142-1150.

Levy, S.B. (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium **207**, S. 1-14, Wiley, Chichester.



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.

MacIntosh, S., Stone, T., Sims, S., Hunst, P., Greenplate, J., Marrone, P., Perlak, F., Fischhoff, D., Fuchs, R. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 56(2):258 - 266.

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

Maiti, I., Gowda, S., Kiernan, J., Ghosh, S. and Shepherd, R. "Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus full length transcript promoter containing single or double enhancer domains", 1997, *Transgenic Res.* 6,143-56

McClintock, J.T., C.R. Schaffer and R.D. Sjoblad. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science* 45:95-105.

McCloskey, W. B. 1998. Weed Management: Transgenics And New Technologies - A Weed Scientists Perspective. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. 1. 25 - 26.

McGregor, S. E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. *Agriculture Handbook No. 496*. U.S. Government Printing Office. Washington, DC.

Metcalfe, D. D., J. D. Astwood, R. Townsend, H.A. Sampson, S.L. Taylor and R.L. Fuchs. 1996b. Assessment of the Allergenic Potential of Foods Derived from Genetically Engineered Crop Plants. *Critical Rev. in Food Science and Nutrition*. 36(s):S165-S186.



Milton Poehlman, John; David Allen Sleper. 1995. Breeding field crops Fourth Edition. Iowa State University Press/Ames

Mitsky, T. 1993. "Comparative Alignment of CP4 EPSPS to Known Allergenic and Toxic Proteins Using the FASTa Algorithm". Monsanto Technical Report MSL-12820, St. Louis, MO.

Morrison, M. 1996. Do ruminal bacteria exchange genetic material? J. Dairy Sci. 79, 1476-1486.

Naylor, M. 1992. Acute oral toxicity study of Btk HD-1 tryptic core protein in albino mice. Submitted to EPA for Monsanto Company's registration for Bt corn.

Naylor, M. 1993. "Acute Oral Toxicity Study of CP4 EPSPS in Albino Mice." Monsanto Technical Report MSL-92542. St. Louis, MO.

Naylor, M. 1993a. Acute oral toxicity study of B.t.t protein in albino mice. Submitted to EPA for Monsanto Company's registration for NatureMark NewLeaf potato.

Naylor, M. 1993b. Acute oral toxicity study of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* [Cry1Ac] HD-73 protein in albino mice. Submitted to EPA for Monsanto Company's registration for Bollgard cotton.

Nielsen, K.M., van Weerelt, D.M., Berg, T.N., Bones, A.M., Hageler, A.N. & van Elsas, J.D. (1997a). Natural transformation and availability of transforming chromosomal DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1945-1952.

Nielsen, K.M., Bones, A.M. & van Elsas, J.D. (1997b). Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3972-3977.

Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K. & van Elsas, J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria, a rare event? *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 79-103.

Nielsen, K.M., Smalla, K. & van Elsas, J.D. (2000a). Natural transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 206-212.



Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000b). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1237-1242.

Novillo, C., Soto, J.Y Costa, J. 1999. Resultados en España con variedades de algodón, protegidas genéticamente contra las orugas de las cápsulas. *Bol. San. Veg. Plagas* 25:383-393

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.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 1999. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Glyphosate Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 10. Health and Safety publications (<http://www.oecd.org/ehs/>).

OGTR (The Australian Office of the Gene Technology Regulator). 2002. Australian Office of the Gene Technology Regulator issues licence for controlled release of GM cotton.

Pacheco Covarrubias, J.J. 1992. Respuesta diferencial de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) a un insecticida y su relación dosis-mortalidad, bajo condiciones del Valle del Yaqui, Son.S.Mex.E., Res XXVII Congr. Nac. Entomol. pp. 310-311.

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.

Padgett, S. R., Barry, G. F., Re, D. B., Eichholtz, D. A., Weldon, M., Kolacz, K., & Kishore, G. M. 1993. Purification, cloning and characterisation of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp.strain CP4, Monsanto Company, USA, MSL-12738.



Padgett, S.R, C.E. Smith, Q. Khaihuynh, and G.M. Kishore. 1988. Arginine chemical modification of petunia hybrida 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, Arch. Biochem. Biophys. 266:254-262.

Padgett, S.R., D.B. Re, C.S. Gasser, D.A. Eichholtz, R.B. Frazier, C.M. Hironaka, E.B. Levine, D.M. Shah, R.T. Fraley, and G.M. Kishore. 1991. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. Journal of Biological Chemistry 266:22364-22369.

Paget, E., Monrozier, L.J. & Simonet, P. 1992. Adsorption of DNA on clay minerals: Protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* 97, 31-40. 20. Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. & Teuber, M. (1997). Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389, 801-802.

Palm, C.J., R.J. Seidler, K.K. Donegan, and D. Harris. 1993. Transgenic plant pesticides: Fate and Persistence in soil. *Plant Physiol. Suppl.* 102, 166.

Palm C.J, Donegan KK, Siedler RJ. 1994. Persistence in soil of transgenic plant-produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 1258-1262.

Palm C.J, Schaller DL, Donegan KK, Seidler RJ. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1258-1262.

Palomo Gil, Arturo. 1996. Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia Páginas* 359-369. Academia Mexicana de Ciencias. México, D.F.

Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. & Teuber, M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389, 801-802.

Pietramellar, G., Dal Canto, L., Vettori, C., Gallori, E. & Nannipieri, P. (1997). Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of DNA bound on clay minerals. *Soil Biol. Biochem.* 29, 55-61.



PLM. 2006. Diccionario de especialidades agroquímicas. 16 Edición. Thomson PLM. México, D.F.

Quiñones-Pando, F.C.; Galván-Lamas, R.; Báez-Iracheta, F. 2000. Tecnología de producción de algodón en la región centro sur del estado de Chihuahua. Centro de Investigación Regional Norte-Centro. INIFAP-SAGAR. Cd. Delicias, Chih. México.

Reicosky, D. C. 1995. Impact of tillage on soil as a carbon sink. In Farming for a Better Environment. Soil and Water Conservation Society, Ankeny, Iowa.

Reicosky, D. C. and M. J. Lindstrom. 1995. Impact of fall tillage on short-term carbon dioxide flux. Pp. 177–187. In R. Lal, J. Kimble, E. Levine, and B. A. Stewart (eds.). Soils and Global Change. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.

Rissler, J. & Mellon, M. (1993). Perils amidst the promise. Ecological risks of transgenic crops in a global market. Union of Concerned Scientists, Cambridge, MA.

Robertson, H.M. & Lampe, D.J. (1995). Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between *Diptera* and *Neuroptera*. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 850-862.

Ronald E. Hileman and James D. Astwood. Amendment to MSL-16095: Bioinformatics Analysis of Insect Protection Protein 2 (IPP2) Sequence Utilizing Toxin and Public Domani Genetic Databases. Report No. MSL-16710

Ronald E. Hileman and James D. Astwood. Bioinformatics Analysis of Insect Protection Protein 2 (IPP2) Sequence Utilizing an Allergen Database. Report No. MSL-16094

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.

Roush, R.T. 1997. Managing resistance to transgenic crops. In *Advances in insect control: the role of transgenic plants* (eds. Carozzi, N. and Koziel, M.) 271-294 (Taylor and Francis, London).



Ruiz-Corral, J.A.; Medina-García, G.; Ortiz-Trejo, C.; Martínez-Parra, R.; González Acuña, I.J.; Flores-López, H.; Byerly-Murphy, K.F. 1999. Requerimientos agroecológicos de cultivos. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, INIFAP, SAGAR. Guadalajara, Jal., México.

SAGAR. 2000. Guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola. SAGAR. México, D.F.

Salgado Sosa, Ernesto. 1996. Nuevas tecnologías para producir algodón en el Sur de Tamaulipas. Campo Experimental Sur de Tamaulipas. INIFAP.

Sanger M, Daubert S and Goodman RM. 1990. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus – comparison with the analogous-35s promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol Biol* 14: 433 - 443.

Salyers, A. (1997a). Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 8-16. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.

Salyers, A. (1997b). Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 43-57. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.

Salyers, A. (1997c). Genetically Engineered Foods: Safety Issues Associated with Antibiotic Resistance Genes. A case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: Genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe. pp. 1-23.

Schluter, K. Futterer, J. & Potrykus, I. (1995). Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs, if at all, at an extremely low frequency. *Biotechnology* **13**, 1094-1098.

Schuler, M. A., E. S. Schmitt, and R. N. Beachy. 1982. Closely related families of genes code for Alpha and Alpha Prime subunits of the soybean 7s storage protein complex. *Nucl. Acids Res.* 10:8225-8244.



- Schulz, A., A. Kruper and N. Amhein. 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiol. Lett.* 28:297-301.
- Serdy, F.S.; Ream, J.E. and Fuchs, R. 1994. Petition for determination of non-regulated status: Bollgard™ cotton line 531 (*Gossyium hirsutum* L.) with the gen form *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Monsanto Company #94-142.
- Smalla, K. van Overbeek, L.S., Pukall, R. & van Elsas, J.D. (1993). Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13, 47-58.
- Solomon, J.M. & Grossman, A.D. (1996). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.* 12, 150-155.
- Southern, E.M. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Spencer TM, Orozco EM, and Doyle RM (1996) Petition for determination of non-regulated status: insect protected corn (*Zea mays* L.) with Cry1Ac gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. DEKALB Genetics Corporation. USDA.
- Stallings, W.C., S.S.Abdel-Meguid, L.W. LIM, H. Shieh, H.E. Dayringer, N.K. Leimgruber, R.A. Stegeman, K.S.Anderson, J.A. Sikorski, S.R. Padgett and G.M. Kishore. 1991. Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5046-5050.
- Steinrucken, H. C. & Amrhein, N. 1980, "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 94, no. 4, pp. 1207-1212.
- Tabashnik, B.E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence, and recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.



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

Tabashnik, B.E., Malvar, T., Liu, Y.-B., Finson, N., Borthakur, D., Shin, B.S., Park, S.H., Masson, L., Maagd, R.A. and Bosch, D. 1996. Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2839-2844.

Tabashnik, B.E., Liu, Y.-B., Malvar, T., Heckel, D.G., Mason L., Ballester, V., Granero, F., Mensura, J.L. and Ferre, J. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12780-12785.

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. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 12, 980-12, 984.

Talipov, Ferdinand S.; Salgado Uriostegui, F.; Catalan Heverastico, C.; Domínguez Marquez, V.; Bahena Lagunas, M. 1995. El cultivo del algodón y su mejoramiento genético en el estado de Guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero. Dirección de Investigación Científica.

Tapp, H., L.Calamai, L. and G. Stotzky. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biol Biochem.* 26:663-679.

Tapp, H., and G. Stotzky. 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1786-1790.

Tapp H, Stotzky G. 1998. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1786-1790.



Taylor, S. L. & Lehrer, S. B. 1996, "Principles and characteristics of food allergens", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 36, no. Suppl, p. S91-S118.

Tebbe, C.C. & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2657-2665.

Tempe, J. & Schell, J. *In: Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides*, A.B. Legocki, Ed. (Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 1977) p.416.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis, 2000. *Nature*, 408 (6814): 796-815.

Thomson, J. 2000. Gene transfer: Mechanisms and Food Safety Risks. Topic 11. Biotech 00/13. Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. 29 May-2 June, 2000. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Traxler, G. and Godoy-Avila, S. 2004. Transgenic cotton in Mexico. *AgBioForum*, 7(1&2): 57-62.

Trolinder, N. L. and J.R. Goodin. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*. 6:231-234.

Tschape, H. (1994). The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. *FEMS Microbiology Ecology* **15**, 23-32.

Umbeck, P., G. Johnson, K. Barton, and W. Swain. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology*. 5:263-266.

Ulloa, M.; Stewart, J.McD.; Garcia-C, E.A.; Godoy-A., S; Gaytan-M, A.; and Acosta N., S.; 2006. Cotton genetics resources in the western states of Mexico: *in situ* conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation. *Genetics Resources and Crop Evolution* (2006) 53: 653 - 668.



Umbeck, P. F., Barton, K. A., Nordheim, E. V., McCarty, J. C., Parrott, W. L., and Jenkins, J. N. 1991. Degree of Pollen Dispersal by Insects from a Field Test of Genetically Engineered Cotton. *J. Econ. Entomology* 84:1943-1991.

USDA. 1995. Availability of Determination of Non-regulated status for genetically engineered cotton. *Federal Register* 60(134):36096-36097.

US Environmental Protection Agency (EPA). 1993. Reregistration Eligibility Decision Document. Glyphosate. List A case 0178. Office of Pesticide Programs. Especial review and Reregistration Division.

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 Rie J, Jansens S, Höfte H, Degheele D, & Van Mellaert H (1989), Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur J Biochem*, 186: 239-247.

Veal, D.A., Stokes, H.W. & Daggard, G. 1992. Genetic exchange in natural microbial communities. *Adv. Microb. Ecol.* **12**, 383-430.

Venkateswerlu, G. and G. Stotzky. 1992. Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiol.* 25:225-233.

Viñuela, E. y del Estal, P. 1999. Efectos secundarios de los plaguicidas en enemigos naturales de algodón y maíz en España. *Revisión Bibliográfica* 11 pp. Datos no publicados.

Welch, A. K., Rahn, P. R., Voth, R. D., Mills, J. A., Shumway, C. R. 1997. Evaluation Of Preplant And Preemergence Herbicides In Roundup Ready® Cotton. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference.* 1. 784 - 785.

Wellington, E.M.H. & van Elsas, J.D. (Eds.) (1992). *Genetic Interactions among Microorganisms in the Natural Environment.* Pergamon Press. Oxford.



Wendel, J.F., 1989. New World cottons contain Old World cytoplasm. Proc. Nat. Acad. Scie. USA 86: 4132-4136.

WHO (World Health Organization). 1994. Environmental Health Criteria for Glyphosate. International Programme on Chemical Safety. Geneva.

WHO (World Health Organization). 1999. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 217: *Bacillus thuringiensis*. Geneva.

Widner, W.R. and Whiteley, H.R. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. 171 (2), 965-974.

Widmer, F., R.J. Seidler, L.S. Watrud, 1996: Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. Mol. Ecol. 5, 603-613.

Williams, Gary M.; Robert Kroes, and Ian C. Munro. 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup® and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31, 117–165.

Witte, W. (1997). Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium **207**, S. 61-75, Wiley, Chichester.

Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**, 996-997.

Yu, L., R.E. Berry and B.A. Croft. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae). J. Econ. Entomol. 90(1):113-118.



ANEXO 1. 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 340, 000 Kg. de semilla de algodón BG2F a partir del 1 de abril de 2012 con el propósito de tener la semilla lista para el inicio de la siembra a partir del 15 de abril de 2012 en las regiones algodoneras del estado de Chihuahua.

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 Cd. 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.

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 el almacén regional de Bayer de México S.A. de C.V.; y de donde, será entonces entregada a los distribuidores y agricultores que la hayan adquirido. Los Campos de producción de los productores cooperantes que adquieran la semilla serán los destinos finales del material.

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.



ANEXO 2: PROTOCOLO

EVALUACIÓN DE LOS BENEFICIOS DE LA TECNOLOGÍA BOLLGARD II®/FLEX® EN EL CICLO AGRÍCOLA P-V 2012 EN CHIHUAHUA

El algodón genéticamente modificado con la tecnología Bollgard II ®/Solución Faena Flex® (B2F) es resistente al ataque de insectos lepidópteros como los gusanos bellotero (*Helicoverpa zea*), tabacalero (*Heliothis virescens*) y rosado (*Pectinophora gossypiella*) y posee tolerancia al herbicida glifosato (nombre comercial FAENA), lo cual permite la aplicación no selectiva de este herbicida para el control de la maleza. Esta tecnología se ha incorporado a las variedades de Bayer CropScience y para este ciclo agrícola se evaluarán los beneficios que aporta en el cultivo del algodón en las zonas algodonerías del estado de Chihuahua.

OBJETIVOS

- A. Realizar un muestreo de los gusanos bellotero, tabacalero y rosado para determinar la eficacia de los transgenes que le confieren resistencia al algodón Bollgard II ®/Solución Faena Flex® a estos insectos lepidópteros.
- B. Desarrollar un estudio de dinámica poblacional de maleza presente en el sitio de liberación (predio).
- C. Efectuar un análisis costo-beneficio total sobre el proceso de producción del algodón Bollgard II ®/Solución Faena Flex® en el cual se compare el control de las plagas, gusano bellotero, gusano rosado y gusano tabacalero, así como el control del complejo de maleza que lo atacan, contra una producción estándar de algodón convencional.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación

El experimento se establecerá en los predios de los agricultores del Estado de Chihuahua en coordinación con un investigador de un centro de investigación reconocido.

Tamaño de la muestra

Se seleccionará una muestra representativa de la zona de liberación del algodón B2F. En esa muestra se levantará la información descrita en el apartado variables a evaluar.



Cultivo y variedades

El cultivo del algodón con una o más variedades mejoradas genéticamente con el evento B2F. El agricultor escogerá la variedad de su preferencia con el evento B2F.

Para el análisis de costo beneficio, el investigador deberá tomar datos del testigo comercial que el agricultor tenga en este mismo predio, o de no tenerlo deberá tomar los datos de un predio cercano para establecer comparaciones con el sistema de control de insectos lepidópteros y de maleza convencional.

Fecha de aplicación del herbicida glifosato

El investigador deberá asesorar las dos o tres aplicaciones según se requieran del herbicida glifosato (nombre comercial FAENA) y registrará las fechas de aplicación.

VARIABLES A EVALUAR

Monitoreo de los gusanos bellotero tabacalero y rosado

MUESTREO INTEGRAL

1. **Muestreo de carga:** se toman 5 metros lineales por predio, distribuidos en un arreglo de cinco de oros. En cada punto de muestreo (de un metro lineal) se registra el número de plantas y se cortan todas las fructificaciones (cuadros, flores y bellotas), colocándolas en una bolsa de papel previamente etiquetada con la localidad y fecha de muestreo. Posteriormente se cuantifica la carga de las plantas separándolas por edades (cuadros, flores, bellotas chicas, bellotas medianas, bellotas grandes y capullos). Es muy importante contar el número de cicatrices de abscisión para ver los efectos de daño de picudo y gusano bellotero. Se obtienen promedios de fructificaciones por metro lineal, por metro cuadrado y por planta. El objetivo es determinar la carga y el estado de desarrollo del cultivo.
2. **Muestreo de daño:** se revisan los cuadros y bellotas de los 5 metros lineales para cuantificar los daños de gusano rosado, picudo, gusano bellotero y conchuela. Se revisan solo 100 fructificaciones en caso de que la carga de los 5 metros lineales exceda de esta cantidad.



3. **Muestreo de terminales:** se revisan 20 terminales alrededor de cada uno de los 5 puntos de muestreo para obtener una muestra total de 100 terminales. También se pueden tomar al azar en todo el campo las 100 terminales. Se registra el número de terminales con huevecillos y larvas de primero y segundo instar de gusano bellotero y tabacalero.

Niveles de infestación para tomar decisiones de control de plagas del algodonoero

Plaga	Niveles de infestación
Gusano rosado <i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders)	12% de bellotas medianas infestadas con larvas de 1º y 2º instar.
Gusano bellotero y tabacalero <i>Heliothis zea</i> (Boddie) <i>Heliothis virescens</i> (Fabricius)	5-6% de terminales infestadas con larvas de 1º y 2º instar

Dinámica poblacional de maleza

Para determinar la dinámica poblacional se **contabilizará** el número de plantas de las diferentes especies de maleza presentes en el área experimental en cada uno de **4 sitios de muestreo** por cada tratamiento en las 4 repeticiones se contabilizarán las especies de maleza presentes en 0.25 m². Se sugiere que se mantengan los puntos de muestreo durante el ciclo del algodonoero.

Se realizará un muestreo antes de la aplicación del herbicida FAENA y hasta 4 muestreos después de cada aplicación a los 7, 14, 21 y 28 días después de aplicar, o bien hasta que se realice la siguiente aplicación del herbicida FAENA. Aquí se deberá registrar la fecha de los riegos.

Análisis costo-beneficio de la tecnología B2F

En el predio del agricultor designado se registrarán las acciones o prácticas realizadas para el control de maleza e insectos lepidópteros y los costos de control asociados en la o las variedades con el evento B2F. Se tomará en cuenta el diferencial en costo de la semilla convencional vs B2F.



El investigador deberá tomar los mismos datos de prácticas y costos de control de maleza e insectos lepidópteros en el mismo predio o predios cercanos donde haya alguna variedad convencional para establecer un comparativo.

REPORTES

Reporte final

Una vez obtenida la información de rendimiento real y de la calidad de fibra se analizará y discutirá esta información y se elaborará el reporte final en forma de artículo científico. Este reporte deberá ser entregado a Bayer de México S.A. de C.V. a más tardar el **30 de noviembre de 2012**.

Calendario de actividades

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



Bayer CropScience

**SOLICITUD DE PERMISO PARA LA LIBERACIÓN AL AMBIENTE
DEL ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO
BOLLGARD II®/SOLUCIÓN FAENA FLEX®
(MON-15985-7 x MON-88913-8)
EN ETAPA EXPERIMENTAL
EN EL ESTADO DE CHIHUAHUA,
DURANTE EL CICLO AGRICOLA P-V 2012**



1. Nombre, denominación o razón social de quien promueve

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

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

Ing. Bitia Osorio Trejo
Tel. 5728 3000 Ext 2786
Tel cel: 55 41922296

Email: bitia.osorio@bayer.com

Dr. Luis Arciga Reyes
Tel. 5728 3000 Ext 2726
Tel cel: 5512954096

E-Mail: luis.arciga@bayer.com

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

- Jonathan Holloway Ph.D. Field Trait Development Manager
Tel.: +1 806 765 8844

E-Mail: jonathan.holloway@bayer.com

- 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**

Dr. Luis Arciga Reyes –Gerente de Negocio BioScience

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

Formación Académica

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

Experiencia Profesional

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

IBQ. Bitia Osorio Trejo – Regulación en Biotecnología

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

Formación Académica

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

Experiencia Profesional

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



Ing. Abraham Sandoval Rodríguez – Desarrollo de productos para BioScience

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.
- Encargado del Sistema de Información Geográfica de las liberaciones de Algodón Genéticamente Modificado al ambiente.
- Promoción y mercadeo de productos.

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

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

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

Enlace de Epidemiología Cuarentenaria

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



I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM

(Referirse al paquete regulatorio del evento genético combinado Bollgard II®/Solución Faena Flex® (MON 15985 x MON 88913) en algodón propiedad de la Compañía Monsanto, se anexa carta).

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

El evento de transformación BOLLGARD II®/SOLUCIÓN FAENA FLEX® , identificador OECD número **MON-15985-7 x MON-88913-8**, denominado por simplicidad en lo sucesivo **BG2F**. El algodón BG2F porta los genes *cp4 epsps* (dos copias), *Cry1Ac* y *Cry2Ab*, los cuales le confieren resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a la aplicación del herbicida Glifosato.

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

Se llevó a cabo 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 figura que se presentan a continuación:

**Cuadro1. Distribución de especies de *Gossypium* en México (ver mapa en el anexo)**

Especie	Ubicación
Estado: Localidades y/o Municipios	
<i>G. aridum</i>	<p>Oaxaca: Tehuantepec, Guiengola, SE de la Ventosa hacia Niltepec, Sante María Huatulco y Juchitán.</p> <p>Guerrero: Acapulco, SE de San Luis, San Pedro y La unión.</p> <p>Michoacán: Villa Victoria, Huacana, Arteaga y cerca de la presa El Infiernillo.</p> <p>Colima: Ixtlahuacan y Tecomán.</p> <p>Jalisco: Chamela, Autlán, Hostotipaquillo, Tomatlán, La Huerta y Barra de Navidad.</p> <p>Nayarit: Nayar, Jesús María, ribera del Río Santiago, Tepic, Pochichitlan y Agua Milpa.</p> <p>Sinaloa: Mocorito, El Caimanero, Rancho Viejo, Cofradia y Culiacán.</p> <p>Veracruz: Actopan.</p> <p>Puebla: Tecamatlán, Jolalpan, San Pedro de las Palmas, Tecuautitlán San Martín.</p>
<i>G. armourianum</i>	Baja California: Golfo de California e Isla San Marcos.
<i>G. davidsonii</i>	<p>Baja California: Arroyo Salado, ribera del Río La Purísima, Sierra de la Giganta, Los Cabos, Santa Anita y La Paz.</p> <p>Sonora: Guaymas.</p>
<i>G. gossypoides</i>	Oaxaca: Santa Ana, Xishilo Cuicallán, San Bartolo Yautepec, Tlacolula y Tehuantepec.
<i>G. harknessii</i>	Baja California: Cieneguita, Isla Margarita, Isla Montserrat, Loreto, La Paz, Isla Coronado, Isla del Carmen y Agua Grande.
<i>G. hirsutum</i>	<p>Baja California: La Paz e Isla Socorro.</p> <p>Campeche: Xpujil, Champotón, Palizada, Constitución y Campeche.</p> <p>Chiapas: Acala, San Nicolas, Palenque y Ocosingo.</p> <p>Guerrero: Acapulco y Río Barbulillas, Zihuatanejo.</p> <p>Jalisco: San Martín de Bolaños, San Martín Hidalgo, La Huerta, Autlán y Malaque.</p>



	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.
<i>G. lanceolatum</i>	Baja California: Isla Socorro.
	Guerrero: Acapulco, José Azueta, Coyuca de Benítez, Coyuca de Catalán y Zihuatanejo.
	Colima: El Huerto e Isla Socorro.
<i>G. laxum</i>	Guerrero: Chilpancingo, Zumpango del Río y al oeste de Milpillas.
<i>G. lobatum</i>	Colima: Coquimatlán.
	Guerrero: Acapulco.
<i>G. thurberi</i>	Chihuahua: Madera y El Lago
	Sonora: Río Bavispe y Hasabas, Horconcitos, Benjamin Hill, Magdalena, Yecora e Himuris.
<i>G. trilobum</i>	Jalisco: Oblatos al norte de Guadalajara.
	México: Polotitlán y Valle de Bravo.
	Michoacán: Benito Juárez.
	Morelos: Yautepec y Cuernavaca.
	Oaxaca: Chiquihuitlán de Benito Juárez.
<i>G. turneri</i>	Sonora: Guaymas y Bahía San Pedro al sur de Hermosillo
<i>G. barbadense</i>	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 las regiones algodoneras del estado de Chihuahua, y mucho menos aún en las áreas dedicadas al cultivo del algodonoero donde se encuentran incluidas las áreas donde se pretende sembrar el algodón BG2F resistente al ataque de insectos lepidópteros y tolerante al herbicida glifosato.

De acuerdo con la comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) cerca del polígono donde se pretende hacer la liberación al ambiente del algodón B2SF se encuentran las siguientes áreas naturales protegidas: El Pinacate y Gran Desierto de Altar; Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado; Sierra de Ajos / Bavispe; Islas del Golfo de California; Bahía de los Ángeles y Salsipuedes y Valle de los Cirios.

Existe, sin embargo, el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V. de no liberar el algodón B2F a una distancia menor a un kilómetro de cualquier ANP o cuerpo de agua.

Además, Niles y Feaster (1984), en Kohel y Lewis, (1984) mencionan que el polen del algodón es pesado y el transporte del mismo por el viento prácticamente es nulo; por lo tanto, la transferencia del polen solo puede darse por medio de los insectos y en este sentido, se ha encontrado que muy poco polen es transferido ya a los 12 metros de la fuente (Kareiva *et al.*, 1994); distancia mucho muy inferior a la que se encuentran las Áreas Naturales Protegidas ya mencionadas, en la que además no se reportan especies sexualmente compatibles con *G. hirsutum*.

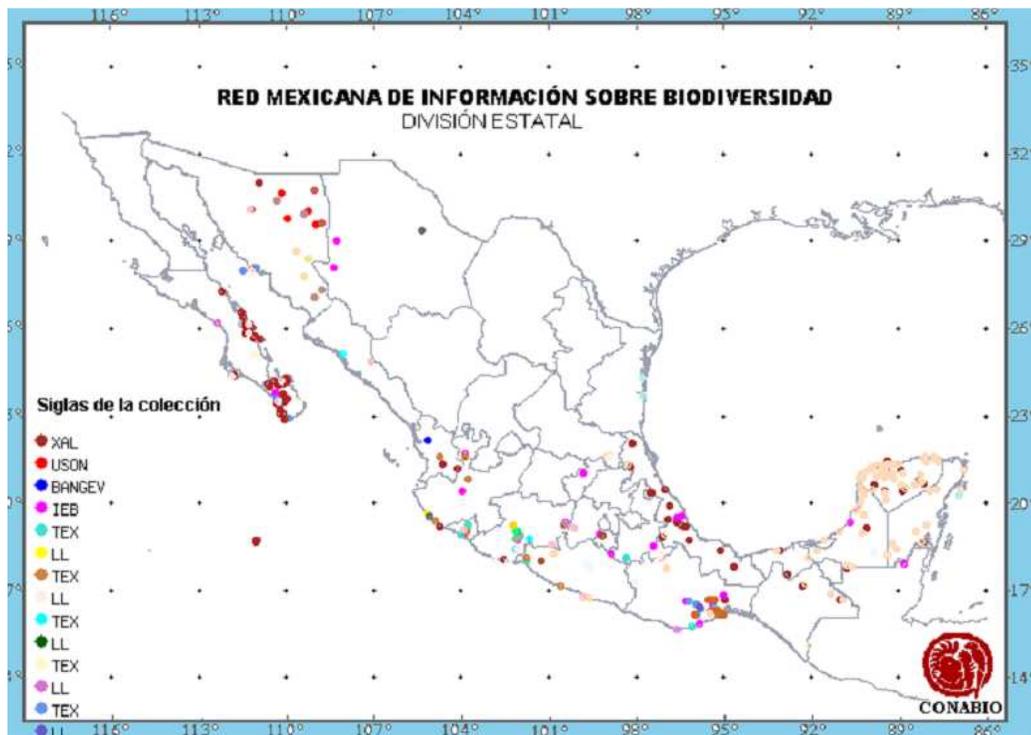


Figura 2. Mapa de distribución generado por la consulta al REMIB en la página de la CONABIO (2006)

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 BG2F 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.



El nuevo rasgo, la resistencia al ataque de insectos lepidópteros y la tolerancia al herbicida glifosato, es la única diferencia con respecto al algodón convencional; por tanto la planta de algodónero BG2F 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 influyen el clima durante el desarrollo de este cultivo.

Siendo el algodónero una planta tropical, es altamente sensible a temperaturas por debajo de los 10° C, y produce poco o nulo crecimiento a temperaturas por debajo de los 15.6° C. La temperatura óptima para el crecimiento de brotes del algodón es aproximadamente 30° C; para crecimiento de raíces la temperatura óptima del suelo es entre 29.4° C y 35° 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: *hirsutum* (2n=52, Upland cotton)

Cultivar: Varias variedades y líneas de mejoramiento

Nombre común: Algodón

Organismo donador

El algodón BG2F es producto del cruzamiento convencional de los eventos Bollgard II (**BG2**) con resistencia al ataque de insectos lepidópteros y Solución Faena Flex (**F**). A continuación se describen los organismos donadores de los genes principales que se integraron en cada evento de transformación.

⇒ Para el evento BG2

Los genes *Cry1Ac* y *Cry2Ab* fueron aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram-positivo que habita de manera natural en el suelo y ha sido utilizada comercialmente durante casi 40 años para el control de



insectos. Produce una proteína (endotoxina) que actúa específicamente sobre las larvas de insectos lepidópteros al destruir su sistema digestivo.

Bacillus thuringiensis

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

⇒ **Para el evento F**

El gen cp4 *epsps* fue aislado de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* raza CP4. *A. tumefaciens* es una bacteria común del suelo que causa la enfermedad de agallas de la corona en plantas susceptibles. No ha habido reportes de efectos adversos en el hombre y los animales.

Agrobacterium tumefaciens

Especie: *Agrobacterium tumefaciens*
Género: *Agrobacterium*
Familia: Rhizobiaceae
Orden: Rhizobiales
Clase: Alpha Proteobacteria
Nombre común: *Agrobacterium*

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

El algodón BG2F fue producido por Monsanto Company en St. Louis Missouri, USA. Bayer CropScience USA ha incorporado la tecnología BG2F a sus variedades.

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 Hawaii. 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 anfidiplóide (**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 cultivadas 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: | <i>G. australe, G. sturtii, G. robinsonii</i> |
| 2. Sección II. | Erioxyla: | <i>G. aridum, G. armourianum, G. lobatum, G. harknessii</i> |
| 3. Sección III. | Klotzchiana: | <i>G. klotzchianum, G. Klotzchianum var davidsonii, G. raimondii</i> |
| 4. Sección IV. | Thurberana: | <i>G. thurberi, G. gossypioides</i> |
| 5. Sección V. | Anomala: | <i>G. triphyllum, G. anomalum</i> |
| 6. Sección VI. | Stoksiana: | <i>G. stocksii, G. longicalyx, G. somalense, G. incanum, G. areisiasum.</i> |

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 Hawaii.

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: *Mariegalante*, *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 Hawaii).

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 inserción;

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, le fueron transferidos los siguientes genes y elementos reguladores.

a) Tecnología Bollgard II® (MON15985-7)

Elementos genéticos presentes en el vector PV-GHBK04 utilizado en la obtención de algodón Bollgard®. La construcción de este vector de un solo borde (derecho) integra dos genes (incluyendo el marcador selectivo NPTII y es introducido al organismo donador mediante el sistema ABI.

Cuadro 2. Resumen de los elementos genéticos del plásmido PV-GHBK04 utilizado para la obtención del algodón Bollgard®

ELEMENTO GENÉTICO	TAMAÑO (Kb)	ORIGEN/FUNCIÓN
Cassette de expresión del gen modificado <i>cry1Ac</i>		
P-E35S	0.62	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciada duplicada usando para dirigir la expresión de la región codificante del gen <i>cry1AC</i> (Kay <i>et al.</i> , 1987).
Cry 1Ac	3.5	Gen de <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. Kurstaki que codifica una variante sintética para la proteína <i>Cry1Ac</i> que confiere resistencia a insectos lepidópteros en plantas. (Adang <i>et al.</i> , 1985).
7S 3'	0.43	Región 3' no traducida de la subunidad alfa del gen de la β -conglucina de la soya (<i>Glycine max</i> L.), el cual controla la terminación transcripcional y dirige la poliadenilación del mRNA del gen <i>cry1Ac</i> (Schuler <i>et al.</i> , 1992).
Cassette de expresión del gen <i>nptII</i>		
P-E35S	0.62	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciada duplicada usando para dirigir la expresión de la región codificante del gen <i>cry1AC</i> (Kay <i>et al.</i> , 1987).
nptII	0.75	Gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II derivado del transposón Tn5 de <i>Escherichia coli</i> . La expresión de este gen en plantas confiere resistencia al antibiótico kanamicina y sirve como marcador de selección (Beck <i>et al.</i> , 1982; Fraley <i>et al.</i> , 1983).
NOS 3'	0.26	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i> el cual controla la terminación de la transcripción y dirige la poliadenilación del mRNA del gen <i>nptII</i> (Fraley <i>et al.</i> ,



1983; Depicker *et al.*, 1982; Baven *et al.*, 1983).

Otros componentes

Borde derecho (RB)	0.09	Secuencia de DNA derivada del plásmido pTiT37 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia de 24 pb del borde derecho (RB) que inicia el evento de transferencia del T-DNA de <i>Agrobacterium</i> a la planta. (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983).
aad	0.79	Promotor bacteriano y secuencia codificante para la enzima 3' (9) nucleotidiltransferasa derivada del transposón Tn7 que confiere resistencia bacteriana a los antibióticos espectinomicina y estreptomomicina (Fling <i>et al.</i> , 1985).
Ori-V	0.62	Origen de replicación para <i>A. tumefaciens</i> derivado de un amplio rango de hospedantes RK2 (Stalker., 1981).
Ori-322/rop	1.8	Origen de replicación derivado del plásmido pBR322 para replicación del plásmido PV-GHBK04 en <i>E. coli</i> . (Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Sutcliffe, 1978).

Elementos genéticos presentes en el PV-GHBK11 utilizado en la obtención del algodón genéticamente modificado Bollgard®II para la introducción del gen *Cry2Ab* en plantas de algodón Bollgard® portadoras del gen *cry1Ac*.

Cuadro 3. Descripción de los elementos genéticos contenidos en el plásmido vector PV-GHBK11

ELEMENTO GENÉTICO	TAMAÑO (Kb)	ORIGEN/FUNCIÓN
Cassette de expresión del gen <i>uidA</i>		
P-e35S	183-797	Promotor 35S del CaMV (virus del mosaico de la coliflor) (Odell <i>et al.</i> , 1985) con la región potenciadora duplicada usando para dirigir la expresión del gen <i>uidA</i> .
Secuencias intermedias	798-828	Secuencia sintética (sitio de clonación múltiple).
<i>uidA</i>	829-2637	Gen del plasmido de pUC19 de <i>Escherichia coli</i> que codifica la proteína β-D-glucuronidasa (GUS) usado como marcador visual para identificar plantas transformadas (Gilissen <i>et al.</i> , 1998).
Secuencias intervénientes	2638-2692	Región sintética (sitio de unión).
NOS 3'	2693-2948	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , el cual termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
Secuencias intervénientes	2949-3013	Secuencia sintética (sitio de unión).
Cassette de expresión del gen modificado <i>cry2Ab</i>		



P-e35S	3014-3627	Promotor 35S del CaMV virus del mosaico de la coliflor (Odell <i>et al.</i> , 1985) con la región potenciadora duplicada usando para dirigir la expresión del gen <i>cry2Ab</i> .
PetHSp70-leader	3628-3727	Secuencia líder 5' no traducida del gen de la proteína de choque térmico HSP70 de petunia.
AEPSPS/CTP2	3729-3959	Secuencia N-terminal del péptido de transferencia al cloroplasto del gen <i>epsps</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Van den Broeck, <i>et al.</i> , 1985).
<i>Cry2Ab</i>	3966-5873	Gen sintético <i>cry2Ab</i> basado en la secuencia del gen de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Widner and Whiteley, 1990).
Secuencias intermedias	5874-5896	Secuencia sintética (sitio de unión).
NOS 3'	5897-6152	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , el cual termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
Otros componentes		
Secuencias intermedias	6153-6277	Secuencia sintética (sitio de unión).
Esqueleto del plásmido	6278-158	(Vieira and Messing, 1987).
lacZ	6278-6516	Secuencia codificadora parcial lacI, el promotor P-lac y la secuencia codificadora parcial para β-D-galactosidasa o la proteína lacZ.
Ori-pUC	6661-7315	Origen de replicación del plásmido que permite la replicación del DNA en una bacteria hospedante como E. coli
nptII (kan)	7396-8363	Gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II de Tn5, un transposón aislado de <i>Escherichia coli</i> (Beck <i>et al.</i> , 1982). El gen nptII también contiene una porción de =.153 kb del gen ble de 0.378 kb del transposón Tn5.
p-kan	8452-8501	Promotor del gen nptII obtenido del transposón Tn5
Secuencias intermedias	159-182	Secuencia sintética (sitio de unión).

b) Tecnología Solución Faena Flex® (MON-88913-8)

Elementos genéticos presentes en el vector PV-GHGT35 utilizado en la obtención del algodón genéticamente modificado solución Faena Flex®

Cuadro 4. Resumen de los elementos genéticos contenidos en el plásmido PV-GHGT35

Elemento genético	Función
Cassette de expresión del gen modificado <i>cp4 epsps</i> regulado por P-FMVTSF1	
P-FMV/TSF1	Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen TSF1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus



	del mosaico de la <i>Scrophularia</i> (FMV).
L-TSF1	Secuencia líder (exón 1) del gen TSF1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica el factor de elongación EF-1alfa
I-TSF1	Intron del gen TSF1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica al factor de elongación EF-1 alfa.
TS- <i>ctp2</i>	DNA derivado de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Péptido de transito al cloroplasto aislado del EPSPS de <i>Arabidopsis thaliana</i> , empleado para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, el sitio de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.
CR- <i>cp4 epsps</i>	Secuencia codificante para la 5-enol-pyruvil-shikimato-3-fosfato sintasa derivada de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa CP4.
T-E9	Secuencia de DNA derivada de <i>Pisum sativum</i> conteniendo la región 3' no traducida del gen <i>rbc E9</i> codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa1, bifosfato carboxilasa de chícharo.
Cassette de expresión del gen modificado <i>cp4 epsps</i> regulado por P-35SACT8	
P-35S/ACT8	Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen ACT8 de <i>Arabidopsis thaliana</i> combinado con secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus del Mosaico de la coliflor.
L-ACT8	Secuencia líder del gen ACT8 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
I-ACT8	Intron y secuencia del exón flanqueante del gen ACT8 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
TS- <i>ctp2</i>	Secuencia de DNA derivado de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Péptido de transito al cloroplasto aislado de la EPSPS al cloroplasto, el sitio de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.
CR- <i>cp4 epsps</i>	Secuencia de DNA codificante para la proteína CP4 EPSPS de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa CP4.
T-E9	Secuencia de DNA derivada de <i>Pisum stivum</i> conteniendo la región 3' no traducida del gen <i>rbc E9</i> , codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa de chícharo.

El número total de pares de bases del PV-GHGT35 usados para crear MON 88913 es de 13,741 pb. Los elementos que componen el vector se detallan en el cuadro 4. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos se muestra en inciso m) y p). Análisis Southern Blot de DNA genómico de MON 988913 muestran la inserción única del T-DNA del plasmado PV-GHGT35 en un solo locus. Los análisis revelan la inserción de dos copias del cassette de expresión CP4 EPSPS, que incluye las secuencias del promotor, potenciador, terminador y péptido de transito (*ctp2*) <http://www.agbios.com> y Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for MON15985 x MON88913.



El número total de pares de bases del PV-GHBK11 usados para crear MON 15985 es de 8,718 pb. Los elementos que componen el vector se detallan en el cuadro 3. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos se muestra en inciso m) y p). Análisis Southern Blot de DNA genómico de MON 15985 muestran la integración de una sola copia en un solo sitio del cassette de expresión de los genes de *cry2Ab* y *uidA*. Este cassette contiene las regiones codificantes para cada gen, aun cuando el sitio de restricción siguiente a la secuencia de poliadenilación de NOS 3' y la secuencia de 260 pb de la región 5' del promotor 35S CaMV para la expresión del gen *uidA* no esta presente. El promotor *uidA* de mantuvo funcional a pesar del truncamiento.

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. (Referirse al paquete regulatorio del evento genético combinado Bollgard II®/Solución Faena Flex® (MON 15985 x MON 88913) en algodón, propiedad de la Compañía Monsanto, se anexa carta).

a) Caracterización molecular del algodón Bollgard®.

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

El segundo inserto de ADN-T contiene una porción de 242 pares de bases de la secuencia de poliadenilación 7S 3' de la región terminal del gen *cry1Ac*. No se detectó transcrito de RNA



por transcripción inversa RT-PCR, que se correspondiera o hubiera sido transcrito del inserto de ADN-T de 242 pares de bases 5' 3', por lo tanto no se produce ningún péptido, según lo esperado.

Los datos individuales de cruzamientos con otras variedades comerciales de algodón demuestran la estabilidad de la transferencia del inserto funcional, de generación en generación. Basándose en análisis moleculares, datos sobre la expresión fenotípica y patrones de herencia, se ha demostrado la integración estable del gen *cry1Ac* dentro del cromosoma del algodón Bollgard®. Los resultados de dichos estudios se resumen a continuación:

- Análisis por Southern (Southern, 1975) blot de numerosas generaciones de algodón Bollgard®, llevados a cabo durante ocho años, han dado como resultado un patrón de Southern blot idéntico, lo que indica la estabilidad del inserto funcional del gen *cry1Ac*.
- Análisis ELISA de semilla obtenida de ensayos en múltiples localidades, durante ocho años, mostraron niveles similares de las proteínas Cry1Ac y NPTII.
- Se ha confirmado la producción de la proteína Cry1Ac por detección inmunológica y/o datos de eficacia bajo diferentes condiciones ambientales, en numerosas variedades de algodón Bollgard®.
- Se observa herencia mendeliana de la característica Bollgard® después de auto-polinización o retrocruzamientos con otras variedades de algodón.
- La eficacia insecticida se ha mantenido durante el desarrollo de este producto, desde su comercialización en 1996.
- La calidad de la semilla del algodón Bollgard® se ha mantenido después de la transferencia del gen *cry1Ac* dentro de distintas variedades comerciales.

De acuerdo con estos resultados, no existe evidencia o probabilidad de inestabilidad genética o de ineficacia. Además, estos datos confirman que la característica Bollgard® está integrada establemente en el genoma del algodón.

**b) Caracterización molecular del algodón Bollgard®II.**

El algodón Bollgard®II evento 15985 contiene dos genes que codifican para las proteínas insecticidas, *cry1Ac* y *cry2Ab*, ambos provenientes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Estos genes codifican proteínas tóxicas a insectos lepidópteros plaga del algodón. El algodón Bollgard II® también contiene los genes *npt II* (marcador de resistencia a kanamicina), *aad* (resistencia a estreptomycin y espectinomycin) y *uidA* (reportero). El gen *aad* no se expresa en plantas debido a que no cuenta con el promotor necesario; este gen fue utilizado como marcador de selección en laboratorio antes de la transformación vegetal como selector para bacterias que contenían la construcción de DNA. El gen *uidA* proviene de la bacteria *Escherichia coli* cepa K12 y codifica la enzima b-glucuronidasa (GUS).

El algodón evento 15985 resistente al ataque de insectos plagas del orden lepidóptera fue desarrollado por el método biobalística empleando el fragmento *KpnI* del plásmido PV-GHBK11 que contiene los casetes de expresión de *cry2Ab* y *uidA*. El evento 15985 no contiene secuencias detectables del esqueleto del plásmido como producto de la transformación. El mapa de restricción del inserto se ilustra a continuación.

c) Caracterización molecular del algodón Solución Faena Flex®.

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

d) Caracterización molecular del algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8)



de manera independiente, por lo tanto, expresa las proteínas provenientes de ambos eventos de transformación. Los estudios de caracterización molecular que confirman la presencia de los eventos MON 15985 y MON 88913 en el algodón MON 88913 × MON 15985 (Bollgard®II/Solución Faena Flex®) son propiedad de Monsanto comercial.

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 Bollgard®II/Solución Faena Flex® fue obtenido por cruzamiento convencional del algodón Bollgard®II (MON-15985-7) con el algodón Solución Faena Flex® (MON-88913-8).

a) Tecnología Bollgard® II (MON-15985-7).

El algodón Bollgard®II fue producido al insertar en el genoma del algodón Bollgard® variedad DP50B (que contiene los genes *cr1Ac* y *npt II*) el gen *cry2Ab*.

I. Bollgard® (MON-00531-6).

El organismo vector es la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* mediante el plásmido PV-GHBK04 (figura 3).

El sistema de transformación con *A. tumefaciens* es ampliamente conocido y ha sido utilizado durante muchos años en la modificación genética de diversas plantas dicotiledóneas. El plásmido vector fue modificado, de manera tal que el sistema de transformación no pudiera transmitir la enfermedad de la agalla de la corona. Este sistema de transformación integra genes del plásmido vector dentro del cromosoma de la célula de la planta de forma estable. La caracterización molecular demostró que se integraron dos insertos de ADN-T (ADN transferido) dentro del genoma del algodón para producir Bollgard®, evento 531. El gen *cry1Ac* segregó de manera consistente con la presencia de una sola copia activa de la región codificante y se transfirió de forma estable, por técnicas de mejora tradicionales, a numerosas variedades comerciales de algodón.

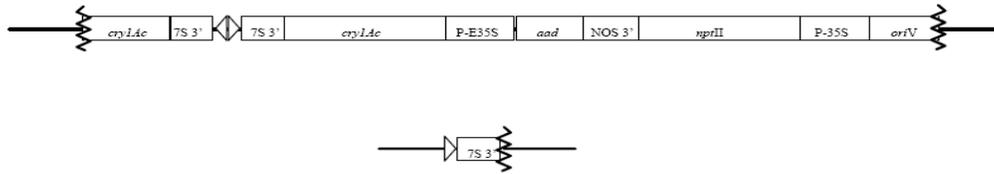


Figura 3. Mapa genético de los genes insertados en el evento MON 00531-6 de algodón resistente al ataque de insectos lepidópteros.

El plásmido vector utilizado dentro de *A. tumefaciens* para producir el algodón Bollgard®, evento 531, contiene la secuencia completa de los genes *cry1Ac*, *nptII* y *aad*. El gen *cry1Ac* deriva de la bacteria común del suelo *B. thuringiensis* variedad *kurstaki* (*B.t.k.*) y codifica la proteína insecticida, Cry1Ac. El cassette del gen *cry1Ac* contiene un promotor e-35S y una secuencia de terminación transcripcional 7S 3'. El gen *nptII* codifica una enzima marcadora de selección, neomicina fosfotransferasa II (NPTII), utilizada para identificar las células de algodón que contenían la proteína Cry1Ac. El gen *nptII* esta controlado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y está seguido por una región de nopalina sintasa (*nos*) 3' que dirige la poliadenilación del RNAm. La proteína NPTII no es útil para ningún otro propósito y carece de propiedades insecticidas. El gen *aad* codifica la enzima marcadora de selección bacteriana 3" (9)-O-aminoglicósido adenililtransferasa (AAD), que permitió la selección de *Agrobacterium*, en medio que contenía espectinomicina o estreptomycin. El gen *aad* esta bajo el control de un promotor bacteriano, y por lo tanto, la proteína codificada no se expresa en las plantas derivadas del algodón Bollgard®, evento 531.

Construcción del plásmido vector PV-GHBK04:

La construcción de este vector de un solo borde (derecho) integra dos genes (incluyendo el marcador selectivo NPT II) y es introducido al organismo donador mediante el sistema ABL. La descripción de los genes quiméricos se detalla bajo el siguiente orden: promotor, región codificadora y la 3' terminal no traducida.

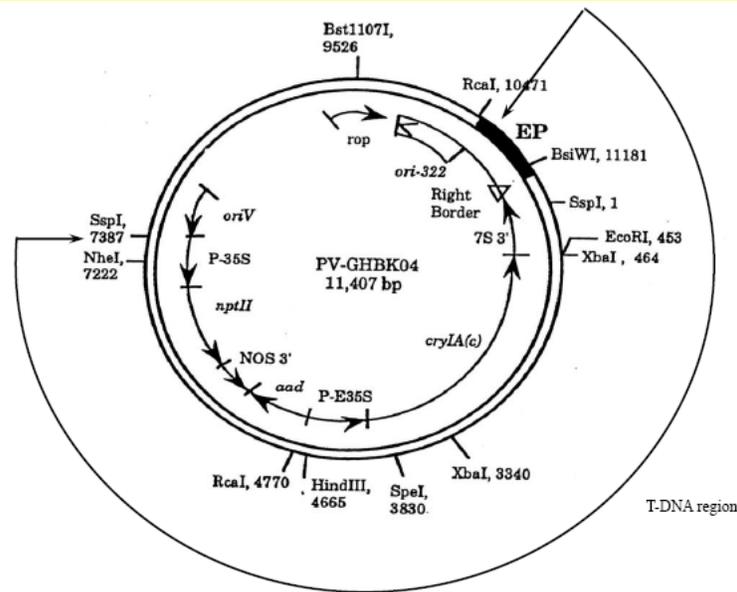


Figura 4. Mapa del plásmido PV-GHBK04 usado para crear el evento MON 00531-6 de algodón resistente a insectos lepidópteros.

- **PE35S** - Es el promotor de 0.6 kb 35S del virus mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.*, 1985) con la región potenciadora duplicada (Kay *et al.*, 1987).
- **Cry1Ac** - FL B.t.k.- Un gen de 3.6 kb que codifica la totalidad de la proteína de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*, esencialmente idéntica a la descrita por Adang *et al.*, 1985. La expresión de este gen en plantas les confiere resistencia a insectos lepidópteros.
- **7S 3'** – La región no traducible de 0.43 kb de la subunidad alfa del gen de la beta conglicina y proporciona la señal de poliadenilación en el mRNA (Schuler *et al.*, 1982).
- **aad** – El gen de 0.79 kb que codifica para 1.0-aminoglicósido adenilil transferasa que permite la selección de bacterias transformantes en espectinomicina o estreptomicina.
- **35S** - Región promotora 35S (0.35 kb) del virus mosaico de la coliflor (CaMV).
- **nptII** - Gen 0.83 kb neomicina fosfotransferasa tipo II que confiere resistencia a Kanamicina (Fraleley, *et al.*, 1983). La expresión de este gen en plantas sirve como un “marcador selectivo” para transformación.
- **NOS 3'** - La región 0.3 kb 3' no traducida del gen nopalina sintasa (Fraleley, *et al.*, 1983).

II. Bollgard® II (MON-15985-7).

El algodón Bollgard®II evento 15985 se obtuvo mediante transferencia de los genes *cry2Ab* y *uidA* al algodón GM Bollgard® variedad DP 50 B (que contenía los genes *cry1Ac*, *nptII* y *aad*). El algodón Bollgard® fue desarrollado empleando el sistema de *A. tumefaciens* con un vector desarmado.

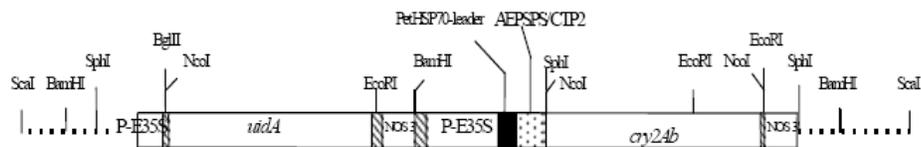


Figura x. Mapa genético de los genes insertados para crear el evento de algodón MON 15985-7 resistente a insectos lepidópteros

El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón Bollgard® DP 50 B (portadora del gen *cry1Ac*) fue el de “biobalística” (John *et al.* 1997) utilizando el plásmido B1579.

Los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* y las proteínas que codifican.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® combinan la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ac y Cry2Ab de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Las proteínas Cry (por “crystalline”; también denominadas proteínas Bt o toxinas Bt) pertenecen a una extensa familia de proteínas producidas por varias subespecies de *B. thuringiensis*. Los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* provienen de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.). Los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* codifican toxinas Bt altamente específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodón: 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) (Dankocsik *et al.* 1990; MacIntosh *et al.*, 1990; Widner & Whiteley, 1989).

El efecto tóxico de las proteínas Bt requiere de condiciones alcalinas (como las proporcionadas en el intestino de la larva del insecto) para que se disuelvan los cristales, digestión parcial por proteasas específicas para que liberen el núcleo activo de la toxina y la unión específica de ésta a receptores presentes en la superficie de las células epiteliales del intestino medio del insecto. La unión específica de la toxina a estos receptores conduce a la formación de poros en la membrana plasmática y a la eventual muerte celular, parálisis intestinal e inanición. Estos son los pasos que proporcionan el alto grado de especificidad para cada proteína Bt (English & Slatin 1992; Hofmann *et al.*, 1988; Knowles & Dow, 1993; Van Rie *et al.*, 1989).

La expresión de los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se encuentra controlada por el promotor mejorado 35S. La región terminadora para el mRNA del gen *cry1Ac* es proporcionada por la región 3' no traducida del gen de la subunidad alfa de la beta conglucina de soja y para el gen *cry2Ab* por la región 3' no traducida del gen *nos* de *A. tumefaciens*.

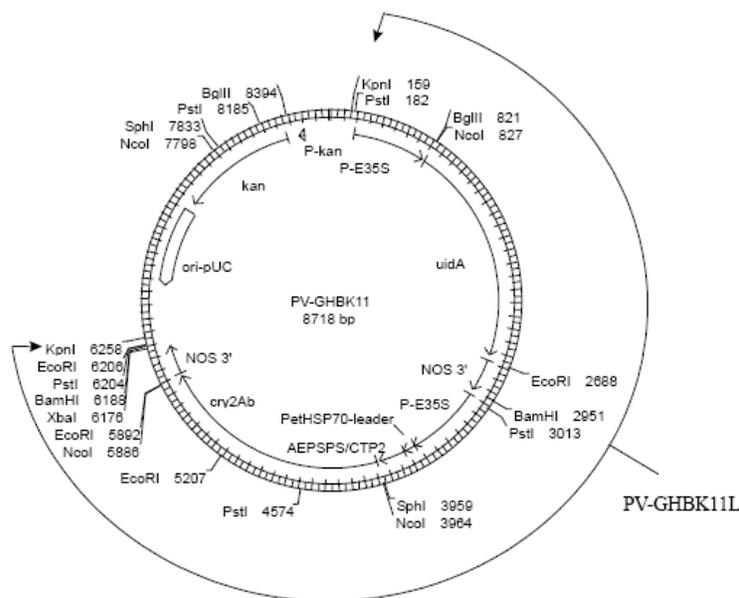


Figura 6. Mapa del plasmido PV-GHBK11 usado para crear el evento de algodón MON 15986-7 resistente al ataque de insectos lepidópteros

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. Al igual que la toxina Cry1Ac que expresan los algodones Bollgard®, la toxina Cry2Ab controla al gusano bellotero y rosado, sin embargo, estudios realizados por Monsanto han confirmado que existen diferencias en los mecanismos insecticidas de estas proteínas. Las pruebas realizadas *in vitro* e *in planta* indican que la combinación de ambas proteínas incrementa la actividad insecticida observada para cada proteína individual. Este incremento en la actividad insecticida sugiere que estas toxinas actúan de manera aditiva. Existen también diferencias entre las proteínas respecto a su nivel de actividad en las diferentes especies de plagas. La proteína Cry2Ab tiene mayor eficacia contra el gusano bellotero (*H. zea*) y cogollero (*S. frugiperda*) que Cry1Ac, pero esta última es más eficaz contra el gusano tabacalero (*H. virescens*) y rosado (*P. gossypiella*). Por lo anterior, las variedades de algodonoero Bollgard®II/Solución Faena Flex® que expresan las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un mejor espectro de control al que ejerce Bollgard® solamente y, por lo tanto, reducen el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo contra ambas toxinas.

El gen reportero *uidA* y la proteína codificada.

Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen el gen reportero *uidA*. Este gen fue empleado como marcador en el laboratorio para seleccionar satisfactoriamente las células de algodón modificado Bollgard®II durante el proceso de transformación. El gen *uidA* proviene de la bacteria *Escherichia coli* y codifica para la enzima beta glucuronidasa (GUS). La enzima GUS transforma un sustrato incoloro a un producto de color azul en un ensayo sencillo y es utilizada como un “marcador” reportero para detectar tejidos que han sido transformados satisfactoriamente. La exposición de tejidos vegetales que contienen la enzima GUS a este sustrato facilita la cuantificación de la expresión del gen *uidA* (Jefferson *et al.*, 1986).

Los genes de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* y las proteínas que codifican.

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contiene los genes marcadores de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* provenientes de *Escherichia coli*. Estos genes fueron empleados durante los pasos iniciales de trabajo de laboratorio para el desarrollo de las plantas de algodón Bollgard®II a fin de permitir la selección de células que contenían la modificación

genética deseada. Ambos genes se emplean comúnmente como marcadores de selección durante la obtención de plantas GM. El gen *nptII* fue aislado a partir del transposón Tn5 (Beck *et al.*, 1982) y codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPT II), que confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina y la neomicina. La enzima NPT II utiliza ATP para fosforilar kanamicina y neomicina, inactivando así los antibióticos y previniendo la muerte de las células que producen NPT II. El gen *npt II* funciona como un marcador de selección en los pasos iniciales de laboratorio donde se seleccionan las células de algodón que han sido modificadas genéticamente, permitiendo su desarrollo mientras que se inhibe el crecimiento de las células que no han sido transformadas. La enzima NPT II se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y en la cadena alimenticia; los microorganismos resistentes a kanamicina se presentan en forma natural en el suelo y en los sistemas digestivos de mamíferos (Flavell *et al.*, 1992). La expresión del gen *nptII* en las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® está controlado por el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y se utiliza como región terminadora del mRNA la del gen *nos* de *A. tumefaciens*.

El gen *aad* fue utilizado en el laboratorio, antes de la producción de las plantas genéticamente modificadas, para selección en bacterias que contenían el plásmido con la construcción a utilizar en la transformación del algodón. Este gen fue aislado del transposón Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina (Davies & Benveniste 1974). El gen *aad* no se expresa en las plantas de algodón debido a que se encuentra bajo el control de su promotor bacteriano, el cual no es activo en plantas y no se han adicionado los elementos genéticos necesarios para su expresión en plantas.

b) Tecnología Solución Faena Flex® (MON-88913-8).

El organismo vector es la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* mediante el plásmido PV-GHGT35 (figura 4). El sistema de transformación con *A. tumefaciens* es ampliamente conocido y ha sido utilizado durante muchos años en la modificación genética de diversas plantas dicotiledóneas. El plásmido vector fue modificado, de manera tal que el sistema de transformación no pudiera transmitir la enfermedad de la agalla de la corona. Este sistema de transformación integra genes del plásmido vector dentro del cromosoma de la célula de la planta de forma estable.

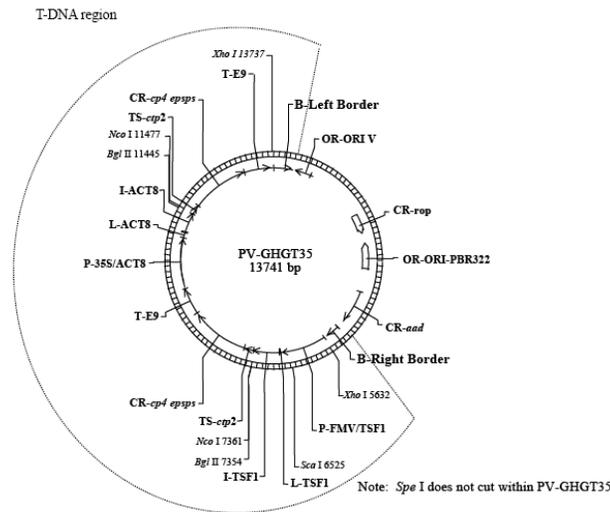


Figura 6. Mapa del plasmido PV-GHGT35 usado para crear el evento de algodón MON 88913-8 tolerante a glifosato

El gen *cp4 epsps* y la proteína que codifica.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen dos copias del gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. El gen *cp4 epsps* codifica una enzima (CP4 EPSPS) que es tolerante a la inhibición por el herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993), y se ha incorporado a las plantas de algodón para conferir tolerancia a las aplicaciones foliares de glifosato. La enzima EPSPS nativa del algodón es susceptible al herbicida glifosato.

En las plantas el gen *epsps* nativo (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) codifica para una enzima (EPSPS) crucial en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina), componentes esenciales de las proteínas. El herbicida glifosato actúa inhibiendo la actividad de la enzima EPSPS de las plantas, bloqueando la biosíntesis de aminoácidos aromáticos impidiendo así la sobrevivencia de las células vegetales (Steinrücken & Amrhein 1980). El gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* es insensible a los efectos del herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993) y es capaz de permitir el funcionamiento normal de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Consecuentemente, en las plantas genéticamente modificadas que contengan el gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* la biosíntesis de aminoácidos aromáticos no

es bloqueada por la presencia del herbicida glifosato y las plantas no mueren cuando se aplica sobre ellas este herbicida.

Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® difieren del algodón Solución Faena® que se comercializa actualmente, que contiene una sola copia del gen *cp4 epsps*, en que la tolerancia al herbicida glifosato es más prolongada. En el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® la aplicación de glifosato para el control de maleza se puede realizar durante el desarrollo del cultivo hasta siete días antes de la cosecha. Por el contrario, si en el algodón Solución Faena® el herbicida glifosato no es aplicado para controlar la maleza por alguna causa, por ejemplo lluvia, cuando la planta llega al estadio de 4ª hoja o 35 días de crecimiento, el herbicida ya no puede ser aplicado sobre el cultivo en estadios de desarrollo posteriores. Por lo tanto el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® tiene la intención de brindar a los agricultores mayor flexibilidad en cuanto a la época de aplicación del herbicida para el control de la maleza.

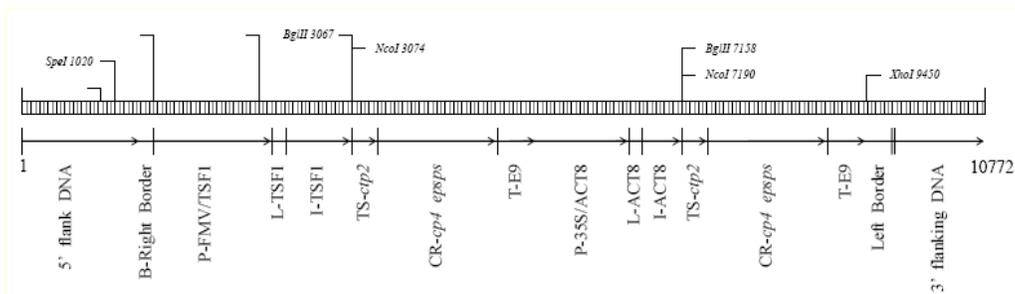


Figura 8. Mapa genético de los genes insertados en el evento de algodón MON 88913-8 tolerante a glifosato

La secuencia del gen *cp4 epsps* en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® ha sido modificada para obtener una expresión óptima en plantas (Padgett *et al.*, 1993). Aún cuando la secuencia se ha modificado, la enzima producida presenta la misma secuencia de amino ácidos que la enzima nativa de *Agrobacterium*. El gen *cp4 epsps* se encuentra unido a la región codificante (fusión traduccional) del péptido de tránsito a cloroplasto del gen *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al.*, 1987). El péptido de tránsito a cloroplasto permite ubicar a la enzima CP4 EPSPS en el organelo, sitio donde se lleva a cabo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. En las plantas la EPSPS es sintetizada como una pre-proteína (contiene el



péptido de tránsito) en ribosomas libres del citoplasma. El precursor es transportado hacia el estroma del cloroplasto y procesado proteolíticamente para que se obtenga la enzima “madura” (della-Cioppa *et al.*, 1986). Una vez “cortado” el péptido de tránsito se degrada rápidamente (Bartlett *et al.*, 1982; della-Cioppa *et al.*, 1986).

En el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se encuentran dos copias del gen *cp4 epsps* y cada copia se encuentra bajo el control de diferentes promotores. Una copia se encuentra bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) mientras que el otro se encuentra bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (FMV). Los promotores 35S dirigen la expresión de los genes *cp4 epsps* a todos los tejidos de la planta durante todo su desarrollo (expresión constitutiva). El algodón GM también presenta elementos promotores adicionales y secuencias no codificantes para mejorar la expresión génica, estos elementos adicionales se han obtenido de otras especies vegetales. La región 3' de las construcciones que permiten la expresión del mRNA de *cp4 epsps* también proviene de otras especies vegetales.

I.k Descripción del método de transformación;

a) Algodón Bollgard®

Para generar el algodón Bollgard® se introdujo el gen *cryAc* a las plantas de algodón de la variedad Coker 312 utilizando la cepa ABI de *Agrobacterium*. Los procedimientos utilizados para la transformación de explantes de hipocotilos de algodón con *Agrobacterium* fueron de acuerdo a los descritos por Umbeck *et al.*, 1987. La regeneración de las plantas se llevo a cabo siguiendo el procedimiento de Trolinder y Goodlin, 1987.

b) Algodón Bollgard®II

El algodón Bollgard®II evento 15985 se obtuvo mediante transferencia de los genes *cry2Ab* y *uidA* al algodón Bollgard® variedad DP50 B (que contenía los genes *cryAc*, *nptII* y *aad*). El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón DP50 B fue el de biobalística (John *et al.*, 1997) utilizando el plásmido B1579.



c) Tecnología Solución Faena Flex®

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

El algodón Bollgard® II/Solución Faena Flex® se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos MON 15985 (algodón Bollgard®II) y MON 88913 (algodón Solución Faena Flex®).

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

No aplica. Aparte del promotor y del terminador antes mencionados no se encuentra alguna otra secuencia incluida en el casete de expresión y sólo una copia de este se encuentra integrada en el genoma del algodón BG2F.

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 BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, expresa las siguientes proteínas novedosas provenientes de ambos eventos de transformación:

a) Proteína cp4 EPSPS

La secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS de 47.2 kDa (455 aminoácidos) codificada por el gen *cp4 epsps* se presenta enseguida:

```
1 mshgassrpa tarkssglsg tvripgdksi shrsfmfggl asgetritgl legedvintg
61 kamqamgari rkegdtwiid gvgnggllap eapldfgnaa tgcrltmglv gvydfdstfi
121 gdasltkrpm grvlnplrem gvqvksedgd rlpvtlrgpk ttpityrvp masaqvksav
181 llaglntpgi ttviepimtr dhstekmlqgf ganltvetda dgvrtirleg rgkltgqvid
241 vpgdpsstaf plvaallvpg sdvtilnvlm nptrtglilt lqemgadiev inprlagged
301 vadlrvsst lkgvtvpedr apsmideypi lavaafaeg atvmngleel rvkesdrlsa
361 vanglkngv dcdegetslv vrgrpdkgl gnasgaavat hldhriamsf lvmglvsenp
421 vtvddatmia tsfpefmdlm aglgakiels dtkaa
```

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

b) Proteína Cry1Ac

La secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ac (1178 aminoácidos) codificada por el gen *cry1Ac* se presenta enseguida:



```

1 mdnnpnec ipynclsne vevlggerie tgytpidis1 sltqfllsef vpgagfvlg1
61 vdiiwgifgp sqwdaflvqi eqningree farnqaisrl eglsnlyqiy aesfrewead
121 ptnpalreem riqfndmnsa lttaiplfav qnyqvpllsa yvqaanlhls vlrdvsvfgq
181 rwgfdaatin sryndltrli gnytdyavr wntglervrg pdsrdwvryn qfrreltltv
241 ldivalfpny dsrrypirtv sqltreiytn pvlenfdgsf rgsaggers irsphlmdil
301 nsitiytdah rgyyywsgqh imaspvfgsf peftfplygt mgnatpqqri vaqlgggvyr
361 tlsstlyrrp fniginnqql svldgtefay gtspnlpasv yrksgtvds1 deippqnnv
421 pprqgfshrl shvsmfrsgf snssvsiira pmfswihrsa efniiasds itqipavkgn
481 flfngsvig pgftggdlvr lnssgnniqs rgyievpihf pststryrvr vryasvtpih
541 lvnwgnssi fsntvpatat sldnlqssdf gyfesanaft sslgnivgvr nfgstagvii
601 drfefipvta tleaeynler aqkavnalf stnqlglktn vtdyhidqvs nltvylsdef
661 cldekrelse kvkhakrlsd ernllqdsnf kdinrperg wggstgitiq ggddvfkeny
721 vtlsgtfddec yptylyqkid esklkaftry qlrgyiedsq dleiyliryn akhetvnpvg
781 tgslwplsqa spigkcgepn rcaphlewnp dldcscrde kcahshhfs ldidvgctdl
841 nedlgvwvif kiktqdggar lgnlefleek plveealarv kraekkrwdk reklewetni
901 vykeakesvd alfvnsqydg lqadtniami haadkrvhsi reaylpelsv ipgvnaaife
961 elegriftaf slydarnvik ngdfnnglsc wnvkghvdve eqnqrsvlv vpeweaevsq
1021 evrvcpgrgy ilrvtaykeg ygegcvtihe iendtdelkf snceveeiyp nntvtcndyt
1081 vnqeeyggay tsrnrgynea pspadyasv yeeksytogr renpcefng yrdytplpvg
1141 yvtkeleyfp etdkvwieig etegtivds velllme

```

La proteína codificada por el gen *cry1Ac* introducido en el algodón Bollgard® es idéntica en longitud (1178 aminoácidos) y 99.4% idéntica en su secuencia de aminoácidos a la proteína codificada por el gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* subs. *Kurstaki* (Adang *et al.*, 1985). La secuencia codificante de este gen ha sido modificada para lograr su óptima expresión en plantas. La expresión del gen está dirigida por el promotor modificado (mejorado) 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.*, 1985; Kay *et al.*, 1987). La terminación transcripcional del mRNA proviene de la región 3' no traducida de la subunidad alfa del gen de la beta-conglicina de la soya (referido como secuencia de terminación 7S 3') (Schuler *et al.*, 1982).

c) Proteína NPTII

La secuencia de aminoácidos de la proteína NPTII (264 aminoácidos) codificada por el gen *nptII* se presenta enseguida:

```

1 mieqdgihag spaawverlf gydwaqqtig csdaavfrls aggrpvlfvk tdlsgalnel
61 qdeaarlswl attgvpcav ldvvtteagr wlllgevpgg dlsshlapa ekvsimadam
121 rrlhtldpat cpfdhqakhr ierartrmea glvdqddlde ehqglapael farlkarmpd
181 gedlvvthgd aclpnimven grfsgfidcg rlgvadryqd ialatrdiae elggewadrf
241 lvlygiaapd sqriafyrll deff

```

El gen *nptII* fue aislado del transposón Tn5 (Beck *et al.*, 1982). Este gen codifica para la expresión de la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII), la cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglicosídicos kanamicina y neomicina. La enzima NPTII

usa el ATP para fosforilar la neomicina y la kanamicina e inactiva el antibiótico evitando su efecto en las células que producen la proteína NPTII. Esta proteína está ampliamente distribuida en el ambiente y las cadenas alimenticias en microorganismos resistentes a la kanamicina que se encuentra de manera natural en el suelo y en los sistemas digestivos de los mamíferos (Falvell *et al.*, 1992).

La expresión del gen *nptII*, presente tanto en el algodón Bollgard® como en el algodón Solución Faena® está controlada por el promotor CaMV 35S (Odell *et al.*, 1985). La terminación transcripcional del mRNA proviene de la región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (*nos*) del plásmido pTiT37 de la cepa T37 de *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982). El gen *nptII* funciona como marcador de selección en las primeras etapas de selección de células transformadas del algodón en el laboratorio (De Block *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1984), permitiendo a las células modificadas desarrollarse en un medio de cultivo selectivo.

d) Proteína AAD

La secuencia de aminoácidos de la proteína AAD (263 aminoácidos) codificada por el gen *aad* se presenta enseguida:

```
1 mreaviaevs tqlsevvgvi erhleptlla vhlygsavdg glkphsdidl lvtvtvrld  
61 ttrralindl letsaspges eilravevti vvhddiipwr ypakrelqfg ewqrndilag  
121 ifepatidid lailltkare hervalvgpaa eelfdpvpeq dlfealnetl tlwnsppdwa  
181 gdernvvtl sriwysavtg kiapkdvaad wamerlpaqy qpvillearqa ylgqeedrla  
241 sradqleefv hyvkgeitkv vgk
```

El gen de resistencia a antibióticos *aad* fue aislado del transposón bacteriano Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomina (Davies & Benveniste, 1974). Este gen codifica la expresión de la enzima 3'(9)-O-aminoglicosido adeniltransferasa (AAD) y está bajo el control de su propio promotor bacteriano. El gen *aad* fue usado en el laboratorio, en la fase previa a la transformación genética de las células de algodón, para seleccionar las bacterias que contenían el plásmido con el ADN de interés.

**e) Proteína Cry2Ab**

La secuencia de aminoácidos de la proteína Cry2Ab (633 aminoácidos) codificada por el gen cry2Ab se presenta enseguida:

```

1 mnsvlmsgrt ticdaynvaa hdpfsfqhks ldtvqkewte wkknhslyl dpivgtvasf
61 llkkvgslyg krilselrnl ifpsgstnlm qdilretekf lnqrlnrtdtl arvnaeltgl
121 qanveefnrq vdnflnprn avplsitssv ntmqqlflnr lpqfqmgyyq llllplfaqa
181 anlhlsfird vilnadewgi saatlrtyrd ylknytrdys nycintyqsa fkglntrlhd
241 mleftrymfl nvfeyvsiws lfkyqsllvs sganlyasgs gppqtqsfts qdwpfplyslf
301 qvnsnyvlnq fsgarlsntf pnivglpgst tthallaarv nysggissgd igaspfnqnf
361 ncstflppll tpfvrswlds gsdregvatv tnwqtgsfet tlglrsgaft argnsnyfpd
421 yfirnisgvp lvvrnedlrr plhyneirni aspsgtppga raymvsvynr knnihavhen
481 gsmihlapnd ytgftispih atqvnnqtrt fisekfgnqg dsrlrfeqnt tarytlrgng
541 nsynlylrvs signstirvt ingrvytatn vntttndgv ndngarfdsi nignvvasn
601 sdvpldinvt lnsqtqfdlm nimlvptnis ply

```

El gen cry2Ab es una versión sintética mejorada del gen nativo de *Bacillus thuringiensis* Subs. *Kurstaki*. La modificación fue necesaria para proveer secuencias controladoras que permitieran una mejor expresión del gen en las plantas de algodón. El gen cry2Ab con su región promotora fue clonado dentro de *Bacillus thuringiensis* cepa EG7699. El producto de la expresión del gen cry2Ab (GenBank accesión No. X55416) tiene una longitud de 633 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 71 kDa (widner and Whiteley, 1990; Dankocsik *et al.*, 1990).

f) Proteína GUS

La secuencia de aminoácidos de la proteína GUS (603 aminoácidos) codificada por el gen de la β -glucuronidasa se presenta enseguida:

```

1 mvrpvetptr eikkldglwa fsldrencgi dqrwwesalq esraiavpgs fndqfadadi
61 rnyagnvwyq revfipkgwa gqrivlrfa vthygkvwn nqevmehqgg ytpfeadvtp
121 yviagksvri tvcvnnelnw qtippgmvit dengkkkqsy fhdffnyagi hrsvmllytpp
181 ntwvdditv thvaqdcnha svdwqvang dvsveldad qqvvatgqgt sgtlqvvnph
241 lwqpeggyly elcvtaksqt ecdiyplrvq irsvavkgeq flinhkpfyf tgfgrhedad
301 lrgkgfdnvl mvhdhalmdw igansyrts h ypyaeemldw adehgivvid etaavgfnls
361 lgigfeagnk pkelyseeav ngetqqahlq aikeliardk nhpsvwmwsi anepdtrpqq
421 areyfaplae atrkldprrp itcvnmfcd ahtdtisdlf dvlclnryyg wyvqsgdlet
481 aekvlekell awqeklhpqi iiteygvdtl aglshmytdm wseeqqcawl dmyhrvdrv
541 savvgeqwn fadfatsqgi lrvggkkgi ftrdrkpksa aflqkrwtg mnfgekpqqg
601 gkq

```

El gen de la β -glucuronidasa, *uidA*, también conocido como *gus* o gen de *gusA*, se deriva de la *Escherichia coli* cepa K12 (Jefferson *et al.*, 1986). La β -D-glucuronidase es una exohidrolasa que cataliza la hidrólisis de una gama de β -glucuronides en sus ácidos



correspondientes y los aglycones (Oshima *et al.*, 1987), incluyendo el substrato artificial p-nitrofenil- β -D-glucuronide. La hidrólisis de este compuesto cromogénico artificial libera un tinte azul que funciona como marcador visible y cuantificable en los procesos de transformación de plantas (Jefferson *et al.*, 1987). La actividad bioquímica y catalítica de esta proteína ha sido estudiada a fondo (Wang and Touster, 1972). Esta proteína se utiliza como marcador que se puede rastrear para identificar aquellas células que serán útiles en el proceso de regeneración.

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

La tolerancia al herbicida Faena Fuerte con Transorb® y resistencia a insectos lepidópteros plaga conferida al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® por expresión de los genes *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 y *cry1Ac* y *cry2Ab* de *Bacillus thuringiensis*, respectivamente, son las características fenotípicas conferidas; la proteína CP4 EPSPS así como las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab no tienen efectos sobre el metabolismo normal de la planta. No se espera que la expresión de las características acumuladas en las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® produzcan efectos interactivos o sinérgicos sobre el metabolismo de las plantas porque involucran distintos mecanismos de acción. La proteína CP4 EPSPS pertenece a la familia de las sintasas EPSPS, las cuales son enzimas involucradas en la penúltima fase de la ruta bioquímica del shikimato para la producción de aminoácidos aromáticos en los cloroplastos de las plantas es tolerante a glifosato y las proteínas Cry actúan mediante acción tóxica selectiva en el intestino de insectos blanco; cada una de las proteínas Cry tiene un receptor específico diferente) y tienen distintos sitios de ubicación en la célula vegetal (la proteína CP4 EPSPS y la Cry2Ab tienen localización en cloroplasto y la Cry1Ac en citoplasma).

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

La proteína Cry1Ac es termolábil y se degrada rápidamente, en menos de 30 segundos, bajo fluidos gástricos simulados de mamíferos (Fuchs *et al.*, 1993). Ninguna de las dos proteínas (Cry1Ac y Cry2Ab) presenta características comunes a las proteínas alergénicas de alimentos. La comparación con las secuencias depositadas en los bancos de datos no ha mostrado similitud



de significancia biológica entre las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab con alérgenos conocidos (Metcalf *et al.*, 1996b). La proteína Cry1Ac en dosis aguda de hasta 4300 mg/kg de peso corporal no ocasiona efectos adversos en ratón (Naylor, 1993a; Naylor, 1993b). De igual forma en estudios de toxicidad oral con ratones empleando la proteína Cry2Ab en dosis de hasta 1450 mg/kg no han mostrado efectos adversos (Bechtel, 1999). Diferentes estudios sobre toxicidad oral aguda de preparaciones microbianas de Bt, conteniendo Cry1Ac y Cry2Aa (alto grado de similitud con Cry2Ab) en mamíferos tales como ratas y conejos han mostrado que no se presentan efectos adversos en dosis muy elevadas (Barbera, 1995; Carter & Liggett, 1994; McClintock *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 1996). Dos estudios por separado en humanos no han encontrado efectos sobre la salud en dosis orales de 1000 mg de esporas de Bt por día durante 3 o 5 días (Betz *et al.*, 2000; McClintock *et al.*, 1995).

La bacteria *Agrobacterium sp.* cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizosfera de las plantas. Únicamente el gen *cp4 epsps* de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes a herbicidas agrícolas de la familia Faena. La secuencia del ADN transferido y de la proteína producida es completamente conocida y se encuentra presente en todas las plantas y en la mayoría de los microorganismos que comúnmente son parte de nuestra dieta, y no existe evidencia de que esta proteína pueda causar algún efecto negativo en la salud humana o de cualquier otro vertebrado. Adicionalmente, no se espera que los humanos estén expuestos a la proteína CP4 EPSPS expresada por el algodón Bollgard II®/Solución Faena Flex® ya que durante el procesamiento para la obtención de aceite de algodón utilizado para el consumo humano no se reporta la presencia de proteína (Fuchs, 1994).

La proteína CP4 EPSPS no presenta homología con las secuencias de aminoácidos de las proteínas tóxicas y alérgicas de las bases de datos Pir Protein, Swissprot (Bairoch and Boeckmann, 1993) y Genpept (Benson *et al.*, 1993). La secuencia de aminoácidos o regiones de alta homología entre dos o más proteínas puede proveer información importante sobre la actividad biológica de una proteína. Es decir, la secuencia de aminoácidos puede proveer información acerca de las propiedades estructurales, hidrofóbicas e hidrofílicas, inmunogenicidad, estabilidad y la posible función de la proteína identificada. El uso de bases de datos ha demostrado ser una excelente herramienta para predecir la función biológica de proteínas desconocidas. La secuencia de la proteína CP4 EPSPS fue comparada con las



secuencias peptídicas identificadas como “alérgenos” y “toxinas” de todas las bases de proteínas disponibles para identificar si la proteína CP4 EPSPS tiene alguna homología con alérgenos o toxinas.

Los resultados muestran que no existe ninguna homología significativa entre las secuencias de los alérgenos y toxinas conocidas y la secuencia de la proteína CP4 EPSPS. La conclusión de que esta proteína no es tóxica está apoyada en los resultados de estudios de toxicología aguda en ratones, donde no se encontró ninguna evidencia de efectos tóxicos en los animales de prueba cuando se administró una dosis de 572 mg/kg de la proteína CP4 EPSPS (Naylor, 1993).

La introducción de variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® tolerantes al herbicida glifosato no posee ningún riesgo de provocar reacciones alérgicas. El aceite de la semilla de algodón es el producto más utilizado para el consumo humano y los antecedentes que reportan el análisis del aceite derivado de variedades Bollgard®/Solución Faena® confirmaron que no existe proteína CP4 EPSPS detectable en el aceite para uso industrial (Fuchs, 1994). Con base en estos resultados no se espera un consumo humano significativo de esta proteína. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS no muestra homología con ninguna de las secuencias de los alérgenos en las tres bases de datos de proteínas actuales (Mitsky, 1993; Genpet, Pir protein y Sw issprot) y, por lo tanto, se concluye que la proteína CP4 EPSPS no presenta ningún potencial de alergenicidad para los humanos.

Adicionalmente, la proteína CP4 EPSPS es rápidamente desnaturalizada por el calor y la digestión enzimática y ácida en fluidos gástricos simulados (ANZFA, 2001b; Canadian Food Inspection Agency 1997; Harrison, *et al.*, 1996). La proteína no presenta homología con la secuencia peptídica de alérgenos depositados en las bases de datos Genpept, Pir y Sw issProt (Mitsky, 1993).

La autoridad alimentaria de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) ha concluido que los alimentos derivados del algodón Roundup Ready® (Solución Faena®), que expresa la misma proteína CP4 EPSPS que el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®, son tan seguros como aquellos derivados de variedades convencionales (ANZFA, 2000). De igual modo la EPA de los Estados Unidos ha brindado de excepción para el requisito de una tolerancia a residuos de la proteína CP4 EPSPS.



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

Secuencia de ADN del promotor P35S3

```
GAATTCCAAATCCACAAAAATCTGAGCTTAAACAGCACAGTTGCTCCTCTCAGAGC
AGAATCGGGTATTCAACACCCTCATATCAACTACTACGTTGTGTATAACGGTCCA
CATGCCGGTATATACGATGACTGGGGTTGTACAAAGGCGGCACAAACGGCGTTC
CCGGAGTTGCACACAAGAAATTTGCCACTATTACAGAGGCCAAGAGCAGCAGCTGA
CGCGTACACAACAAGTCAGCAAAACAGACAGGTTGAACTTCAATCCCAAAGGAGAA
GCTCAACTCAAGCCCAAGAGCTTTGCTAAGGCCCTAACAAAGCCACCAAAGCAAA
AAGCCCACTGGCTCAGCCTAGGAACCAAAGGCCAGCAGTGATCCAGCCCCAAA
AGAGATCTCTCTTTGCCCGGAGATTACAATGGACGATTTCTCTATCTTTACGAT
CTAGGAAAGGAAGTTTGAAGGTGAAGGTGACGACACTATGTTCAACCCTGATAATG
AGAAGGTTAGCCCTTCAATTTTCAAGAAAGAAATGCTGACCCACAGATGGTTAGAGA
GGCCTACGCAGCAGGTCATATCAAGACGATCTACCCGAGTAACAATCTCCAGGAG
ATCAAATACCTTCCAAAGAAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAAAGATTCAGGACTAAAT
GCATCAAAGAACACAGAGAAAAGACATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGT
ATGGACGATTCAAGGCTTGCCTTCAATAAACCAAGGCCAAGTAAATAGAGATTGGAGTC
CTAAAAAGGTTAGTTCTTACTGAAATCTAAGGCCATGCATGGAGTCTAAGATTCAA
ATCGAGGATCTAACAGAACTCGCCGTGAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTC
TTTTACGACTCAATGACAAGAAAGAAAATCTTCTGTCACATGGTGGAGCACGACAC
CTGGTCTACTCCAAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAAAGGGCTATT
GAGACTTTTTCAACAAAGGATAATTTTCGGGAAACCTCTCCTGGATTCCATTGCCAG
CTATCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAATG
CCATCATTGCCGATAAAGGAAAGGCTATCATTC AAGATGCCCTCTGCCGACAGTGGT
CCCAAAGATGGACCCCAACCACGAGGAGCATC GTGGAAAAAGAACGTTCCAA
CCACGTC TTCAAAGCAAGTGGAATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGA
CGCACAAATCCACTATCTTTCCGCAAGACCC TTCCTCTATAATAAGGAAGTTCATTT
CATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCAC CAGTCTCTCTCTATAAAATCTATCTCTCT
CTCTATAACC
```

Secuencia de ADN del terminador 3'nos

```
CGAAGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAAATCC TGGT
GCCGGTCTTGGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAA
TAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGT
CCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAC TAG
GATAAATTA TCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCG
```

Ninguna de las secuencias reguladoras pertenece a la especie receptora. El promotor y terminador utilizados para la expresión de la proteína cp4 epsps son ampliamente descritas en Klee, Muskopf and Gasser, 1987.



```

1851 AAAATGGCCT CCATTATTTG GCTTATTCAA TCAAAAAGTTT ACAAACACTAG
1901 TGCAAATTTA ATATGATAAT GTCTACAAGA ACCAAATACG AATTGAGTAA
1951 ATTTT TTTTGG CTAAAATAAA TTACGAATTG ATGAATTATC ATTTTAAAAA
2001 GTTCTTTTAA ACCATTTCTT TTA CTGAATT AAAAAAAGGT TTTATTAATC
2051 ATATATATTA CAAATTACC ATTAAGTAGC CAAATTACAA ATTTTAATTC
2101 AATGTAGTCA AACACTGATA GTTTAAACAT GACTCTCTTA AGGTAGCCAA
2151 AGCCCGGGCT TAATTAAGGC GCGCCGGCCA AGTCGGCCGC GGC CGCTTA
2201 TCAAGCTTCT GCAGGTCTTG CTGAGTGGGA AGCTAATTCT CAGTCCAAAG
2251 CCTCAACAAG GTCAGGGTAC AGAGTCTCCA AACCATTAGC CAAAAGCTAC
2301 AGGAGATCAA TGAAGAATCT TCAATCAAAG TAACTACTG TTCCAGCACA
2351 TGCATCATGG TCAGTAAATT TCAGAAAAAG ACATCCACC G AAGACTTAAA
2401 GTTAGTGGGC ATCTTTGAAA GTAATCTTGT CAACATCGAG CAGCTGGCTT
2451 GTGGGGACCA GACAAAAAAG GAATGGTGCA GAATTGTTAG GCGCACCTAC
2501 CAAAAGCATC TTTGCCTTTA TTGCAAAGAT AAAGCAGATT CCTCTAGTAC
2551 AAGTGGGGAA CAAAATAACG TGGAAAAGAG CTGTCTGAC AGCCCACTCA
2601 CTAATGCGTA TGACGAACGC AGTGACGACC ACAAAGAAT TAGCTTGAGC
2651 TCAGGATTTA GCAGCATTCC AGATTGGGTT CAATCAACAA GGTACGAGCC
2701 ATATCACTTT ATTCAAATTG GTATCGCCAA AACCAAGAAG GAACTCCCAT
2751 CCTCAAAGGT TTGTAAGGAA GAATTCGATA TCAAGCTTGA TATCGGAAGT
2801 TTCTCTCTTG AGGGAGGTTG CTCGTGGAAT GGGACACATA TGGTTGTTAT
2851 AATAAACCAT TTCCATTGTC ATGAGATTTT

```

Sequence Illustration

1 - 2106 Plant DNA
2107 - 2880 P-FMV/TSF1/EF-1 α

Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen TSF1 de *Arabidopsis thaliana* y secuencias potenciadas del promotor 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (FMV) (<http://gmdd.shgmo.org>).



```

1 TGACCGAAGT TAATATGAGG AGTAAACAC TTGTAGTTGT ACCATTATGC
51 TTATTCACTA GGCAACAAAT ATATTTTCAG ACCTAGAAAA GCTGCAAATG
101 TTACTGAATA CAAGTATGTC CTCTTGTGTT TTAGACATT ATGAACTTTC
151 CTTTATGTAA TTTTCCAGAA TCCTTGTFCAG ATTCTAATCA TTGCTTTATA
201 ATTATAGTTA TACTCATGGA TTTGTAGTTG AGTATGAAAA TATTTTTTAA
251 TGCATTTTAT GACTTGCCAA TTGATTGACA ACATGCATCA ATCGACCTGC
301 AGCCACTCGA GTGGAGGCC CTCTAAGCC CCCATTTGGA CGTGAATGTA
351 GACACGTCGA AATAAAGATT TCCGAATTAG AATAATTGT TTATTGCTTT
401 CGCCTATAAA TACGACGGAT CGTAAATTGT CGTTTTATCA AAATGTACTT
451 TCATTTTATA ATAAAGCTGC GGACATCTAC ATTTTTGAAT TGAAAAAATA
501 TTGGTAATTA CTCTTTCTTT TTCTCCATAT TGACCATCAT ACTCATTGCT
551 GATCCATGTA GATTTCCCGG ACATGAAGCC ATTTACAATT GAATATATAT
601 TACAAAGCTA TTTGCTTATA ACATATGCGA AAAATTTGT ACTATAATCA
651 GGGGTAAATT TAGGAGGGGG CTGTAGGTC TCGCTTCTCT TAAAATGAAA
701 AATTTTCTAT TTAGTTATTT AAAATTTTAA AAGTAAAATA TAAAATTTTC
751 ATTTAATCCT TTA AAAATTA TAAAGATATA GACTATTAAT ATGATGAAAT
801 TACAATTTTA TTATCATAAA AATTATAATT TAATTTGAC CCCTAACAAA
851 ATTTTCTGAT TTTGCCCTA ACTGTATAT TTGTATAAAA ACATTTTCTT
901 TTTGCATTIA ATGATTTCTT TAATTCAGTC CAAGAAAAGAA ATTATTAAT
951 TGCATATGCG AAAGTTAGTC CTGTCCTAGT GATATTAAG GAAAGAAAACA

```

Sequence Illustration

1- 300 E9

301- 598 plasmid flanking

599- 1675 Plant DNA

Secuencia de DNA derivada de *Pisum sativum* conteniendo la región 3' no traducida del gen rbc E9 codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa1, bifosfato carboxilasa de chícharo (<http://gmdd.shgmo.org>).

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

De los organismos donadores:

a) *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva, facultativa anaeróbica que forma inclusiones de proteína adyacente a la endospora. Las subespecies de Bt pueden sintetizar más de una inclusión parasporal. Estas inclusiones están formadas por diferentes proteínas cristal insecticida (PCI). Los cristales o el complejo de espora/cristal de un Bt esporulado deben ser ingerido por las larvas susceptibles. La eficacia de los cristales en el intestino medio del insecto depende de la solubilización de los cristales, de la conversión de la protoxina a la toxina biológicamente activa por las enzimas proteolíticas, de los receptores específicos ensamblado por el dominio terminal-C de la toxina activa y la formación de un poro por el dominio terminal-N con el rompimiento de las células epiteliales. La germinación de la espora y la proliferación de las células vegetativas dentro del homocelo del insecto podrían resultar en una septicemia contribuyendo a la muerte del insecto. Los receptores

ensamblados por el cristal es el principal determinante de la especificidad del hospedero debido a la existencia de diferentes cristales presentes en cada una de las cepas de Bt.

La proteína producida en el algodón Bollgard (CryIAc) es 99.4% idéntica a la proteína producida por *Bacillus thuringiensis* subespecies *kurstaki* (B.t.k.) de la cepa HD-73. Esta cepa controla insectos plagas por la producción de las proteínas cristal insecticida conocidas como delta-endotoxinas. La proteína delta-endotoxina producida por varias subespecies de Bt exhiben diferencias en la secuencia de aminoácidos para el dominio terminal amino de las proteínas. Estas diferencias son importantes en la acción selectiva contra ciertos insectos plagas. Lo más importante, la acción de la proteína de Bt no tienen efecto contra organismos no blancos tales como los peces, aves y mamíferos debido a que tienen los receptores en el intestino medio. Esto explica la ausencia de toxicidad de la proteína delta endotoxina de B.t.k. a los organismos no blancos. La proteína B.t.k. expresada en el algodón Bollgard® muestra especificidad solamente a los insectos del orden lepidóptera y no tiene ningún efecto dañino sobre los organismos no blancos.

Cry2Ab es una versión sintética mejorada del gen nativo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. La modificación fue necesaria para proveer secuencias controladoras que permitieran una mejor expresión del gen en las plantas de algodón. El gen *cry2Ab* con su región promotora fue clonado dentro de *Bacillus thuringiensis* cepa EG7699. El producto de la expresión del gen *cry2Ab* fue aislado y purificado de la cepa bacteriana modificada EG7699. La proteína *Cry2Ab* (GenBank Acceso No. X55416) tiene una longitud de 633 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 71 kDa (Widner and Whiteley, 1990; Dankocsik *et al.*, 1990).

b) *Agrobacterium* sp. cepa CP4

Agrobacterium tumefaciens es un fitopatógeno que habita de manera natural en el suelo, el cual utiliza un proceso de ingeniería genética natural para alterar la maquinaria metabólica de las células de la planta hospedante. Este proceso hace que las plantas hospedantes desvíen suministros de carbono y nitrógeno orgánico para la producción de nutrientes (opinas) que pueden ser específicamente catabolizados por la bacteria invasora (Tempe and Schell, 1977). Las células infectadas son inducidas a proliferar. La enfermedad de la agalla de la corona es

el resultado directo de la incorporación de una región de ADN-transferible (ADN-T), del plásmido circular Ti (inducción de tumor) de 150 a 250 kB, transferido por *A. tumefaciens* dentro del genoma de la planta hospedante. Cuando *Agrobacterium* es aislada de las raíces de las plantas en ambientes naturales o bajo cultivo, la mayoría de las cepas (más del 90%) no son patogénicas, aún cuando muchos aislamientos son hechos de plantas enfermas. Por lo tanto, *Agrobacterium* es esencialmente un habitante de la rizosfera y únicamente una proporción muy pequeña de cepas son fitopatógenas (contienen el plásmido Ti), las cuales causan la enfermedad conocida como agalla de la corona en un amplio rango de plantas dicotiledóneas especialmente rosáceas como manzana, pera, durazno, cereza, almendra, frambuesa y rosal. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de un tumor al nivel del suelo y aunque reduce el valor comercial de la cosecha, generalmente no causa problemas serios en plantas maduras bien establecidas. La bacteria entra a la planta a través de heridas y transfiere una fracción de su ADN, denominada ADN-T, a las células de las plantas causando la formación de un tumor. El tumor se desarrolla debido a que el ADN-T contiene genes que regulan la biosíntesis de hormonas vegetales como el ácido indolacético y citocininas. Las células infectadas producen unas sustancias denominadas opinas, las cuales son usadas por la bacteria como fuente de energía. El desarrollo de los síntomas en la planta infectada depende de la temperatura, humedad y estado de crecimiento; conforme el tumor incrementa su tamaño la habilidad de la planta para obtener nutrientes disminuye y finalmente detienen su crecimiento con lo cual también empieza la decadencia del tumor liberando las bacterias en el suelo. La bacteria puede permanecer activa en el suelo o en tumores viejos en ausencia de un hospedero adecuado durante un mínimo de dos años y puede dispersarse a través del movimiento de suelo infectado, implementos agrícolas, escurrimiento de agua o a través de insectos succionadores de savia (López, 1994). Generalmente las bacterias se reproducen por bipartición. Tras la duplicación del ADN, dirigida por la ADN-polimerasa que se encuentra en los mesosomas, la pared bacteriana crece hasta formar un tabique transversal separando las dos nuevas bacterias. Además de este tipo de reproducción asexual, las bacterias poseen mecanismos de reproducción sexual, mediante los cuales se intercambian fragmentos de DNA, los cuales pueden ser:

- Transformación: Consiste en el intercambio genético producido cuando una bacteria es capaz de captar fragmentos de ADN, de otra bacteria que se encuentran dispersos en el medio donde vive.

- **Conjugación:** En este proceso, una bacteria donadora F+ transmite a través de un puente o pili, un fragmento de DNA, a otra bacteria receptora F-. La bacteria que se llama F+ posee un plásmido, además del cromosoma bacteriano (intercambio de plásmido entre bacterias compatibles).
- **Transducción:** En este caso la transferencia de ADN de una bacteria a otra, se realiza a través de un virus bacteriófago, que se comporta como un vector intermediario entre las dos bacterias. Algunas bacterias encontradas en el suelo como las especies fitopatógenas del género *Agrobacterium* pueden transferir DNA a las plantas a través del mecanismo denominado transformación (transferencia viral de DNA dentro de una bacteria) (Morrison, 1996; Davison, 1999; Thomson, 2000).

En general la habilidad de las bacterias para aceptar ADN del ambiente varía marcadamente entre las diferentes especies y la frecuencia de transformación, aún bajo condiciones ideales, es muy baja. *Agrobacterium tumefaciens* son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gramnegativas, flageladas, peritricas; forma colonias mucoides y blancas. La composición de bases de DNA varía de 58 a 63.5% GC.

c) Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV)

El Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) es un Caulimovirus presente en la naturaleza en plantas crucíferas (col, coliflor, colza, mostaza); también se ha reportado en cacahuate, soya y casava. Los Caulimovirus representan uno de los dos grupos de pararetrovirus vegetales que incluye al promotor 35S. El otro grupo, Badnavirus, se encuentra en forma natural en banana, cacao, cítricos, camote, piña y caña de azúcar. Las partículas del CaMV contienen una molécula circular de DNA de doble cadena. En el núcleo de las plantas huéspedes el DNA se presenta como minicromosoma cuya transcripción produce moléculas de RNA. Este RNA es el templado para la transcriptasa reversa que produce copias de ADN del CaMV que será empacado en nuevas partículas virales. El RNA se utiliza para la síntesis directa de proteínas virales dentro de las que se incluye las que integran la cápside.

d) Figwort Mosaic Virus (FMV/CMoVb; Virus del Mosaico de la *Scrophularia*)

Caulimovirus del grupo pararetrovirus, muy similar al virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Se reportó por primera vez en *Scrophularia californica* en 1982. Familias con hospederos



susceptibles: Scrophulariaceae. Los viriones no presentan envoltura; nucleocápsides isométricas de 50 nm de diámetro, redondas. Los viriones contienen una molécula de DNA de doble cadena circular (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002). El FMV ha sido secuenciado y se han encontrado ocho marcos de lectura abiertos, siete de los cuales corresponden en tamaño y localización al CaMV. Se han desarrollado vectores de expresión en plantas empleando secuencias del FMV (Matai *et al.*, 1997). El promotor del FMV se ha caracterizado y se tiene que es constitutivo en la mayoría de los tejidos vegetales, su fuerza es comparable o más fuerte que el promotor CaMV y mucho mayor que el promotor de la nopalina (Sanger *et al.*, 1990; Matai *et al.*, 1997). El promotor del FMV posee doble potenciadores y el eliminar uno reduce su actividad en 75%. El FMV posee señales de poliadenilación similares al CaMV. El FMV es un promotor útil alternativo al promotor del CaMV para el desarrollo de plantas GM.

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 gossipol y ácidos grasos ciclopropenoides (CPFA, cyclopropenoid fatty acids), los cuales son tóxicos naturales.

El gossipol 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 gossipol 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 gossipol 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 gossipol unido de esta manera no está disponible para los animales.

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).

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 reportero *uidA* y la proteína codificada.

Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen el gen reportero *uidA*. Este gen fue empleado como marcador en el laboratorio para seleccionar satisfactoriamente las células de algodón modificado Bollgard®II durante el proceso de transformación. El gen *uidA* proviene de la bacteria *Escherichia coli* y codifica para la enzima beta glucuronidasa (GUS). La enzima GUS transforma un sustrato incoloro a un producto de color azul en un ensayo sencillo y es utilizada como un “marcador” reportero para detectar tejidos que han sido transformados satisfactoriamente. La exposición de tejidos vegetales que contienen la enzima GUS a este sustrato facilita la cuantificación de la expresión del gen *uidA* (Jefferson *et al.*, 1986).



Los genes de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* y las proteínas que codifican.

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contiene los genes marcadores de resistencia a antibióticos *npt II* y *aad* provenientes de *Escherichia coli*. Estos genes fueron empleados durante los pasos iniciales de trabajo de laboratorio para el desarrollo de las plantas de algodón Bollgard®II a fin de permitir la selección de células que contenían la modificación genética deseada. Ambos genes se emplean comúnmente como marcadores de selección durante la obtención de plantas GM. El gen *nptII* fue aislado a partir del transposón Tn5 (Beck *et al.*, 1982) y codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPT II), que confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina y la neomicina. La enzima NPT II utiliza ATP para fosforilar kanamicina y neomicina, inactivando así los antibióticos y previniendo la muerte de las células que producen NPT II. El gen *npt II* funciona como un marcador de selección en los pasos iniciales de laboratorio donde se seleccionan las células de algodón que han sido modificadas genéticamente, permitiendo su desarrollo mientras que se inhibe el crecimiento de las células que no han sido transformadas. La enzima NPT II se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y en la cadena alimenticia; los microorganismos resistentes a kanamicina se presentan en forma natural en el suelo y en los sistemas digestivos de mamíferos (Flavell *et al.*, 1992). La expresión del gen *nptII* en las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® está controlado por el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y se utiliza como región terminadora del mRNA la del gen *nos* de *A. tumefaciens*. El gen *aad* fue utilizado en el laboratorio, antes de la producción de las plantas genéticamente modificadas, para selección en bacterias que contenían el plásmido con la construcción a utilizar en la transformación del algodón. Este gen fue aislado del transposón Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina (Davies & Benveniste 1974). El gen *aad* no se expresa en las plantas de algodón debido a que se encuentra bajo el control de su promotor bacteriano, el cual no es activo en plantas y no se han adicionado los elementos genéticos necesarios para su expresión en plantas.

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

El algodón Bollgard®II contiene una copia completa de los genes transferidos, mismos que se integraron de manera estable al genoma del algodón.

Datos de segregación a través de cuatro generaciones se compararon y la frecuencia de los individuos esperados con los observados que expresaban la proteína cry2Ab. La expresión de la proteína Cry2Ab se analizó mediante ELISA. Todas las generaciones segregaron una sola



inserción del gen cry2Ab. La presencia de la proteína Cry2Ab a través de múltiples generaciones siguió el patrón de herencia mendeliana. La presencia del gen cry2Ab fue confirmada mediante análisis Southern blot.

La estabilidad de la inserción se demostró mediante un análisis Southern blot de ADN genómico de muestras tomadas de tejido de hojas a través de cinco generaciones. No hubo diferencias en el patrón de hibridación entre los fragmentos de ADN extraído de cualquiera de las cinco generaciones. Estos resultados demuestran que la inserción de ADN plásmido PV-GHBK11 es estable en el genoma de plantas a través de cinco generaciones de mejoramiento.

El algodón Solución Faena Flex® se ha llevado por cinco generaciones de retrocruzas sin pérdida del fenotipo de tolerancia a glifosato o rearrreglo de los elementos genéticos transferidos. El material genético y los segregantes del material transferido no presentan el fenotipo de tolerancia al herbicida. Datos obtenidos de análisis de hibridación Southern indican que todos los elementos genéticos transferidos, incluyendo regiones codificantes, promotores y regiones no codificantes, se encuentran presentes como insertos únicos de manera estable en el algodón Solución Faena Flex® (MON 88913) y de que no se encuentran secuencias del vector no requeridas.

La estabilidad de la tolerancia a glifosato se evaluó mediante análisis Southern blot. La primera generación resultante de la auto polinización segregaron en una proporción 3:1 (resistentes y no resistentes). Generaciones avanzadas (R4 y R5) de plantas homocigotas auto polinizadas segregaron en una proporción 1:0. Estos resultados no son significativamente diferentes a lo esperado de acuerdo la herencia mendeliana; y confirman la homocigosis y estabilidad del carácter dominante a través de múltiples generaciones.

I.t Referencia bibliográfica sobre los datos presentados

<http://www.agbios.com>



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

Se realizará la liberación del algodón BG2F Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) en una superficie de 20 000 ha, las cuales quedan contenidas en el polígono que se anexa en el siguiente inciso. Se importará 340,000 kg de semilla (En el [anexo 1](#) se presentan más detalles).

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

Cuadro 5. Los Polígonos de liberación al ambiente tienen los extremos:

Zonas Agrícolas de Aldama, Chihuahua					
Vértice	Latitud	Longitud	X	Y	Zona
0	30.06409	-105.6858	433897.9281	3326085.257	13
1	29.29365	-105.2448	476224.1614	3240545.072	13
2	28.55245	-105.933	408734.9796	3158757.729	13
3	28.43797	-106.30116	372581.6209	3146409.145	13
4	29.56833	-106.48039	356597.6815	3271868.683	13
5	29.63057	-106.21373	382502.8775	3278465.999	13
6	29.61986	-106.04112	399203.0357	3277116.617	13
7	29.66454	-106.05979	397440.6763	3282084.072	13
8	29.71403	-105.8804	414843.3435	3287422.546	13
Zonas Agrícolas de Camargo, Chihuahua					
0	28.29341	-103.48019	649034.5364	3130642.617	13
1	27.44838	-103.74369	624152.6239	3036726.505	13
2	27.64265	-104.32986	566106.8028	3057797.264	13
3	27.86671	-104.87948	511864.3844	3082443.118	13
4	28.01835	-104.90433	509404.9243	3099238.774	13
5	28.45569	-104.88749	511015.3858	3147688.307	13
6	28.45414	-104.97342	502602.3743	3147511.729	13
7	28.81853	-105.03589	496498.2282	3187881.083	13
8	28.63409	-104.73012	526378.3868	3167476.784	13
9	28.62734	-104.24037	574252.9109	3166935.051	13

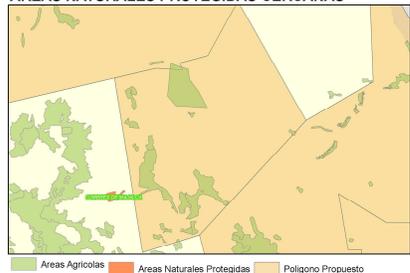


ANEXO: POLIGONO DE LIBERACION PROPUESTO PARA ALDAMA, CHIHUAHUA

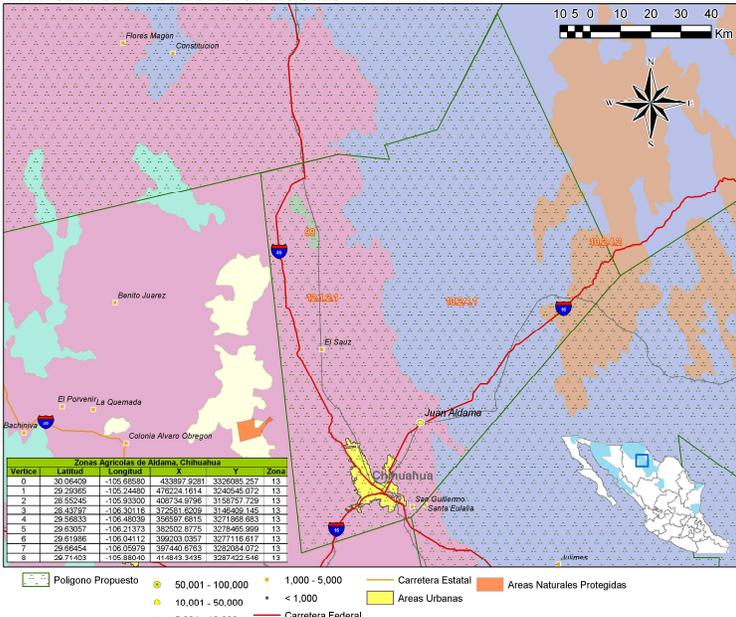
MUNICIPIOS CUBIERTOS



AREAS NATURALES PROTEGIDAS CERCANAS



MAPA GENERAL Y CLAVE DE ECORREGIONES



Nota:

La determinación de los polígonos de liberación se ha realizado con la finalidad de tratar de abarcar la mayoría de las áreas agrícolas de cada zona algodонера. Estas zonas agrícolas, en su mayoría, cumplen con los requerimientos necesarios de grado de salinidad, tipo de suelo, disponibilidad de agua y nivelación de suelo para poder tener una producción satisfactoria de fibra de algodón al final del ciclo. Como compromiso de la empresa queda declarado que antes de la distribución de la semilla se realizarán reuniones con agricultores para hacer hincapié en las zonas donde se puede y donde no se puede realizar la siembra de algodón, aun cuando se podría conocer por anticipado, que esta actividad solo se realiza en los lugares apropiados para ello.

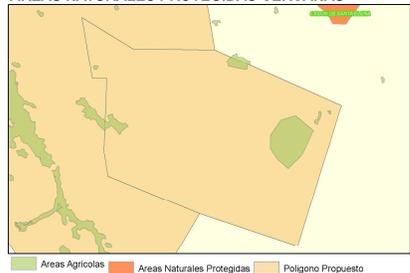


ANEXO: POLIGONO DE LIBERACION PROPUESTO PARA CAMARGO, CHIHUAHUA

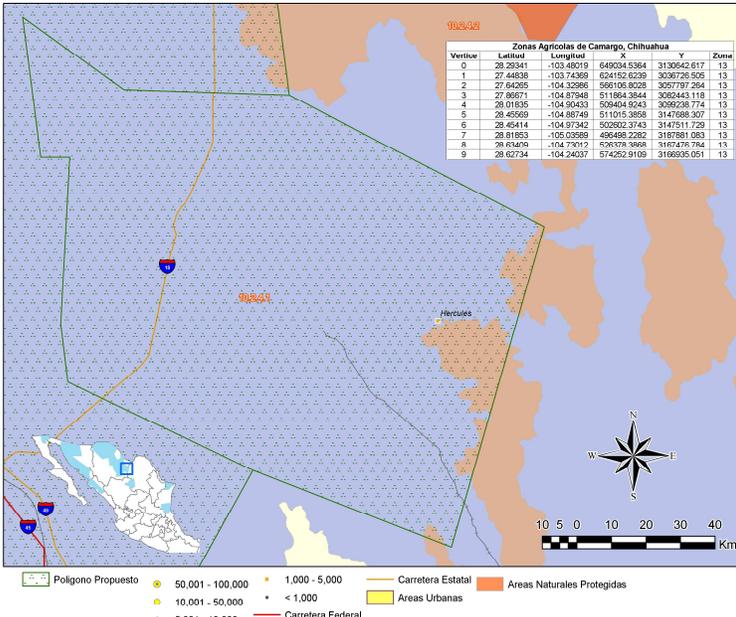
MUNICIPIOS CUBIERTOS



AREAS NATURALES PROTEGIDAS CERCANAS



MAPA GENERAL Y CLAVE DE ECORREGIONES



Nota:

La determinación de los polígonos de liberación se ha realizado con la finalidad de tratar de abarcar la mayoría de las áreas agrícolas de cada zona algodонера. Estas zonas agrícolas, en su mayoría, cumplen con los requerimientos necesarios de grado de salinidad, tipo de suelo, disponibilidad de agua y nivelación de suelo para poder tener una producción satisfactoria de fibra de algodón al final del ciclo. Como compromiso de la empresa queda declarado que antes de la distribución de la semilla se realizarán reuniones con agricultores para hacer hincapié en las zonas donde se puede y donde no se puede realizar la siembra de algodón, aun cuando se podría conocer por anticipado, que esta actividad solo se realiza en los lugares apropiados para ello.



Figura 9. Polígono (seccionado) donde se liberará el algodón B2F en el Estado de Chihuahua (Se anexa mapa con mayor detalle en el CD).



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

II.c.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 las áreas de liberación propuestas y aún cuándo existen al Sur del Estado colectas de algodón *Gossypium barbadense*, este no compatible sexualmente con *G. hirsutum*. 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.

II.c.2 Descripción geográfica

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en las regiones algodoneras del estado de Chihuahua, las cuales incluyen a los municipios de Buenaventura, Ahumada, Coyame del Sotol, Ojinaga, Aldama, Namiquipa, Chihuahua, Aquiles Serdán, Rosales, Camargo, Julimes, Meoqui, Saucillo, La Cruz, San Francisco de Conchos, Sierra Mojada, Jiménez.

Adyacente a estas regiones algodoneras se encuentran las siguientes Áreas Naturales Protegidas: Cumbres de Majalca y Cañón de Santa Elena.

Existe, sin embargo, el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V de no realizar ninguna liberación al ambiente del algodón B2F fuera de los polígonos solicitados y áreas agrícolas actualmente establecidas.

En el mapa anexo del polígono de liberación propuesto para el estado de Chihuahua, se resaltan las áreas naturales protegidas cercanas al polígono propuesto.

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



Figura 10. Mapa con las principales vías de comunicación en el Estado de Chihuahua



III. ESTUDIO DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGMS PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA a los que se refiere el artículo 42, fracción III, de la Ley. Contendrá, además de lo dispuesto en el artículo 62 de la Ley, la información siguiente (Referirse al paquete regulatorio del evento genético combinado Bollgard II®/Solución Faena Flex® (MON 15985 x MON 88913) en algodón, propiedad de la Compañía Monsanto, se anexa carta):

III.a Estabilidad de la modificación genética del OGM

El algodón Bollgard®II contiene una copia completa de los genes transferidos, mismos que se integraron de manera estable al genoma del algodón.

Datos obtenidos de análisis de hibridación Southern indican que todos los elementos genéticos transferidos, incluyendo regiones codificantes, promotores y regiones no codificantes, se encuentran presentes como insertos únicos integrados de manera estable en el algodón Solución Faena Flex® (MON 88913) y de que no se encuentran secuencias del vector no requeridas. El algodón Solución Faena Flex® se ha llevado por 5 generaciones de retrocruzas sin pérdida del fenotipo de tolerancia a glifosato o rearrreglo de los elementos genéticos transferidos. El material genético transferido se hereda siguiendo un patrón Mendeliano para genes únicos y dominantes y los segregantes del material transferido no presentan el fenotipo de tolerancia al herbicida.

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

a) Niveles de expresión de las proteínas Cry1Ac y NPTII en plantas de algodón Bollgard

Las proteínas Cry1Ac y NPTII se producen en bajos niveles (partes por millón o µg/gr) en varios tejidos de la planta de algodón Bollgard®. Los datos generados a partir de muestras recogidas en 1992 se presentan en los cuadros 6 y 7.

Las proteínas Cry1Ac y NPTII se detectaron en el evento 531 y no fueron detectadas, según lo esperado, en la línea parental Coker 312. Los niveles medios de la proteína Cry1Ac en 1992, fueron 1.56 y 0.86 µg/gr peso fresco en hoja y semilla de algodón sin procesar, respectivamente. Los niveles medios de la proteína NPTII en 1992, fueron 3.15 y 2.45 µg/gr peso fresco, para hoja y semilla de algodón sin procesar, respectivamente. Las muestras de varias localidades, en ocho años de ensayos en campo, muestran niveles

medios de la proteína Cry1Ac en semilla de algodón sin procesar que variaron de aproximadamente 1 a 9 µg/gr de peso fresco. En semilla de algodón sin procesar, el nivel medio de la proteína NPTII varió de 2.0 a 15 µg/gr de peso fresco entre las mismas localidades y años de ensayo en campo.

Cuadro 6. Niveles de proteínas Cry1Ac, NPTII y AAD en tejido de hoja de algodón en 1992 (µg/g peso fresco)

Analizado	Coker 312^a	Línea 531 (Bollgard®)^a
Cry1Ac media	ND	1.56
Rango	NA	1.18 - 1.94
error std	NA	0.15
NPTII media	ND	3.15
Rango	NA	2.46 - 3.84
error std	NA	0.270
AAD media	ND	ND
Rango	NA	NA
error std	NA	NA

^a Media de niveles de expresión a lo largo de las localidades de ensayo en campo. N=36.6 muestras por cada una de seis localidades.

ND=no-detectable; NA=no aplicable

Cuadro 7. Niveles de expresión de proteínas Cry1Ac, NPTII y AAD en semilla de algodón en 1992 (µg/g peso fresco)

Analizado	Coker 312^a	Línea 531^a
Cry1Ac media	ND	0.86
rango	NA	0.40 - 1.32
error std	NA	0.18
NPTII media	ND	2.45
rango	NA	1.97 - 2.93
error std	NA	0.19
AAD media	ND	ND
rango	NA	NA
error std	NA	NA

^a Media de niveles de expresión a lo largo de las localidades de ensayo en campo. N=36.6 muestras por cada una de seis localidades.

ND=no-detectable; NA=no aplicable.



La proteína Cry1Ac no fue detectada en néctar recolectado de algodón Bollgard®, utilizando un ensayo con un límite de detección de 1.6 ng/g (0.001 ppm) de peso fresco de néctar. La proteína Cry1Ac está presente en el polen a niveles por encima del límite de detección del ensayo utilizado para evaluar las concentraciones de la proteína Cry1Ac: 11.5 ng/g peso fresco de polen.

Después del procesado, los niveles de proteína Cry1Ac fueron reducidos a niveles no-detectables en la mayoría de los productos procesados de semilla de algodón: aceite refinado, fibras marrones y harina de semilla de algodón. La proteína Cry1Ac no fue detectada por ELISA o bioensayo con insectos, en la harina de semilla de algodón procesada. Se encontró que el contenido de proteína total en el aceite refinado de semilla de algodón estaba por debajo del límite de detección del ensayo (1.3 ppm).

Se analizaron las fibras largas de la semilla de algodón Bollgard® para medir la presencia de la proteína Cry1Ac, utilizando análisis de western blot y bioactividad. La proteína Cry1Ac fue detectada a 0.1 µg/g de peso de fibras sin procesar. Después del procesamiento de las fibras a fibras marrones o a fibras de algodón más purificadas, la proteína Cry1Ac no fue detectada a un límite de detección de 0.08 µg/g de peso.

b) Niveles de expresión de las proteínas Cry2Ab en el algodón Bollgard®II

Se cuantificaron los niveles de las proteínas Cry2Ab en muestras que fueron colectadas de 8 localidades donde se realizaron evaluaciones de prueba durante 1998, mismas que son representativas de las principales regiones algodonerías de los Estados Unidos y presentan una diversidad de condiciones ambientales.

Producción de la proteína Cry2Ab.

Los niveles de la proteína Cry2Ab en hojas jóvenes se mantuvo constante a lo largo de las diferentes evaluaciones y localidades, con valores de 10.1 a 33.3 microgramos/g de peso fresco y con una media a lo largo de las localidades de 23.8 +/- 6.3 microgramos/g peso fresco.



Los niveles de la proteína Cry2Ab en el tejido de la semilla también fue consistente a lo largo de todas las localidades con valores de 31.8 a 50.7 microgramos/g de peso fresco con una media de 43.2 +/- 5.7 microgramos/g peso fresco.

La producción promedio de la proteína Cry2Ab en una planta completa fue de 8.80 +/- 1.2 microgramos/g peso fresco con un rango entre localidades de 7.28 –10.46 microgramos/g de peso fresco. En polen la proteína Cry2Ab no fue detectada por arriba del límite de detección del ensayo (0.25 microgramos/g).

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, no existen la posibilidad de interacción entre los dos tipos de proteínas que pertenecen a vías metabólicas diferentes.

c) Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en el algodón Solución Faena Flex®.

Los niveles de la proteína CP4 EPSPS en el algodón MON 88913 fueron determinados por un método validado de análisis inmunoenzimático ELISA (del inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Los niveles de la proteína CP4 EPSPS en hojas jóvenes, hojas de todo el ciclo, raíces, semillas y polen fueron determinados en tejidos de algodón MON 88913 colectados en ensayos de campo con replicación a través de Estados Unidos durante 2002. Los niveles de proteína CP4 EPSPS para todos los tipos de tejido fueron calculados en microgramos (μg) por gramo (g) de peso fresco. El contenido de humedad se determinó para las hojas jóvenes, hojas de todo el ciclo, raíces y semillas en donde también se calculó en microgramos (μg) por gramo (g) de peso seco. El nivel promedio de proteína CP4 EPSPS en cuatro localidades para hojas jóvenes, hojas de toda el ciclo, raíces y semillas de algodón MON 88913 fue de 970, 1400, 690, 630, 99 y 340 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente. El nivel promedio de proteína CP4 EPSPS en polen en cuatro localidades fue de 4.0 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.



III.c Características del fenotipo del OGM

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen dos copias del gen *epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. El gen *cp4 epsps* codifica una enzima (CP4 EPSPS) que es tolerante a la inhibición por el herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993), y se ha incorporado a las plantas de algodón para conferir tolerancia a las aplicaciones foliares de glifosato. La enzima EPSPS nativa del algodón es susceptible al herbicida glifosato. Las plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® difieren del algodón Solución Faena® que se comercializa actualmente, que contiene una sola copia del gen *cp4 epsps*, en que la tolerancia a herbicidas agrícolas de la familia Faena es más prolongada. En el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® la aplicación de herbicidas agrícolas de la familia Faena para el control de maleza se puede realizar desde el establecimiento de las plantas de algodón hasta 7 días antes de la cosecha. Por el contrario, si en el algodón Solución Faena® los herbicidas agrícolas de la familia Faena no son aplicados para controlar la maleza por alguna causa, por ejemplo lluvia, cuando la planta llega al estadio de 4ª hoja o 35 días de crecimiento, el herbicida ya no puede ser aplicado sobre el cultivo en estadios de desarrollo posteriores. Por lo tanto el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® tiene la intención de brindar a los agricultores mayor flexibilidad en cuanto a la época de aplicación del herbicida para el control de la maleza.

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

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, no existen características físicas y fenotípicas nuevas que puedan tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y 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

El algodón Bollgard® es sustancialmente equivalente a los algodones convencionales, excepto para las secuencias genéticas insertadas, las proteínas expresadas (proteína Cry1Ac y la enzima neomicinafosfotransferasa) y la capacidad de la planta para resistir el daño de los insectos del orden Lepidóptera.



En las observaciones morfológicas realizadas en campo no se detectaron diferencias morfológicas, de crecimiento o de desarrollo entre el algodón Bollgard® y el Coker 312. Es decir, no se encontraron diferencias en germinación, morfología, tiempo de floración y fructificación, formación y desarrollo de bellotas, y rendimiento. Con respecto a los análisis de calidad de fibra, no se observaron diferencias entre al algodón Bollgard® y el coker 312 en relación al micronaire, longitud, resistencia, elongación y porcentaje de fibra (bajo condiciones en las que se controlaron las plagas en el Coker 312).

No se encontraron diferencias con respecto a la susceptibilidad a las plagas no blanco entre el algodón Bollgard® y el Coker 312, es decir la respuesta del algodón Bollgard® y el Coker 312 fue muy similar a las siguientes plagas tales como la mosquita blanca, gusano soldado, minador de la hoja, chinche Lygus, pulgones y al picudo del algodonoero. Asimismo, no se encontraron diferencias a la susceptibilidad a las enfermedades como Rhizoctonia y Agrobacterium entre el algodón Bollgard® y el Coker 312. Por ultimo, la sobrevivencia de las semillas provenientes del algodón Bollgard® que se queda en el campo después de la cosecha no fue diferente a las semillas provenientes del Coker 312.

Para el **algodón Bollgard® II** se cuantificaron diferentes variables para determinar morfología y madurez, incluyendo: aspecto general de la planta, días a la emergencia, vigor de la planta, conteo de plantas establecidas, relación de altura: nudo, número de días a la primera flor blanca, días a la primera bellota abierta, numero de días al 50% de bellotas abiertas, retención de fruto (el porcentaje del fruto en primera posición retenido en el 95% de la zona), mapeo de planta y días a cosecha. Cualitativamente entre todas las evaluaciones de campo de 1998 y 1999 no se observaron diferencias en apariencia entre el evento 15985 y las plantas usadas como testigo que estuvieran fuera de la variabilidad natural de la variedad DP50. El desarrollo del cultivo, su crecimiento y vigor no fueron diferentes entre el algodón evento 15985 y las plantas usadas como testigo DP50B en ninguna de las localidades evaluadas para las mediciones de la relación altura: nudo, fechas de floración y conteos de bellotas.

En algodón **Solución Faena Flex®**. No se detectaron diferencias en las características fenotípicas entre el MON 88913 y el algodón convencional.

Los datos fenotípicos indican que el MON 88913 no posee ninguna ventaja comparable a otro algodón que tuviera como resultado el de incrementar su potencial de maleza.



Se llevó a cabo una cuidadosa caracterización fenotípica del MON 88913 comparando múltiples características fenotípicas, incluyendo 11 características durante el crecimiento y el desarrollo vegetal, 20 características de mapeo de la planta, cuatro de medidas cápsula/semilla de la planta, 6 características de la calidad de la cápsula y de la fibra, múltiples regímenes de germinación de la semilla, ocho características reproductivas morfológicas y 69 de componentes. Además, se recolectaron datos de observación sobre la presencia y cualquier respuesta diferencial a factores de estrés (plagas y enfermedades) bióticos y abióticos. Estas medidas son bien conocidas por los fitomejoradores del algodón y pueden proporcionar datos suplementarios para determinar las interacciones planta- plaga.

Las conclusiones generales de esta extensa caracterización fenotípica fueron que no existen diferencias biológicas significativas en términos de potencial como plaga entre el MON 88913 y el MON 88913(-) y que la modificación fenotípica del algodón ha sido únicamente con respecto a la tolerancia al herbicida glifosato que se buscaba.

El algodón BG2F fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón Bollgard®II (MON 15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto, no existen diferencias fenotípicas comparado con el algodón 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

Ninguno. El algodón con características de resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al uso de herbicidas tiene una historia larga de uso seguro.

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

Para la detección e identificación del evento MON 88913-8, se ha desarrollado un protocolo de PCR cualitativo en el cual se utilizan los genes insertados y regiones cercanas del DNA de la planta (receptora) como primers, para detección específica.



De la misma manera para la detección e identificación del evento MON 15985-7, se ha desarrollado un protocolo de PCR cualitativo en el cual se utilizan los genes insertados y regiones cercanas del DNA de la planta (receptora) como primers, para detección específica.

Para la detección e identificación del evento apilado Bollgard® II/Solución faena Flex® cualquier de los métodos antes mencionados se puede aplicar.

Los métodos de identificación se describen ampliamente en la referencia anexa que aparece con el nombre de **Compendium of referent methods for GMO analysis**.

También pueden consultarse en el website of the European Food Safety Authority (EFSA) en la siguiente dirección:

http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc_reference_report_2010_11_gmo_analysis_compendium.pdf

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 algodón es muy baja.

III.i Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados

Van Deynze *et al.*, 2005.



IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD A LLEVAR A CABO

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 la cosecha del algodón BG2F. Las actividades incluyen:

- Efectuar una localización georreferenciada de los lotes de los agricultores cooperantes que siembren el algodón BG2F con el propósito de tener un control sobre los sitios de liberación y de esa manera evitar que se siembre en predios no autorizados.
- 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 BG2F. Además, todo el personal involucrado deberá saber que debido a que el algodón BG2F tiene como característica la tolerancia a la aplicación del herbicida Glifosato y resistencia a insectos lepidópteros, es posible detectarlo con facilidad con respecto a otro tipo de algodones.

El plan de capacitación incluye:

Grupo de Capacitación	Responsable de la capacitación	Fecha de la capacitación
Distribuidores y personal regional de Bayer CropScience	Personal de asuntos regulatorios y técnicos de Bayer CropScience BioScience	15-30 marzo de 2012
Técnicos locales	Personal de asuntos regulatorios y técnicos de Bayer CropScience BioScience y Distribuidores y personal regional de Bayer CropScience	1-15 abril de 2012
Agricultores cooperantes	Distribuidores y personal regional de Bayer CropScience y técnicos locales	1-15 abril de 2012



- Proporcionar la asistencia técnica necesaria a los agricultores para un adecuado manejo del cultivo por parte de un investigador o técnico reconocido de la zona.

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).

Los refugios son diseñados caso por caso, considerando la biología del insecto y el sistema de cultivo.

En los refugios se producirán insectos sin historial de selección por las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, mismos que al dispersarse como adultos se cruzarán con insectos que eventualmente fueran seleccionados como resistentes en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.

El requisito del establecimiento de refugios forma parte de las autorizaciones emitidas por la SAGARPA. Los refugios se pueden establecer de acuerdo con una de las siguientes dos alternativas:

Refugio 80:20: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®, 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*.



Refugio 96:4: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bollgard II®/Solución Faena Flex®, 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, metomilo, monocrotofós, sulprofos, thiodicarb, profenofos y piretroides sintéticos (cyflutrina, bifentrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina, lambda cyhalotrina, tralometrina y otros).

La determinación de líneas base de susceptibilidad a las proteínas Bt expresadas en el algodón Bollgard II®/Solución Faena Flex®, y el subsecuente monitoreo de la resistencia son parte integral del plan de manejo de resistencia de plagas.

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

El programa de monitoreo se realizará en las zonas donde se siembre el algodón biotecnológico durante un periodo de un año, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento BG2F y procediendo a su destrucción. Se implementarán las siguientes estrategias:

- Se deberá llevar a cabo un monitoreo voluntario de todos los campos 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 BG2F deberá hacerse monitoreos voluntarios durante un periodo no menor a los 12 meses después de la cosecha o 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 cosecha, mensualmente y cuando se observan plantas voluntarias éstas deberán ser destruidas antes de que floreen, con una aplicación dirigida de glufosinato de amonio o de manera manual. Cuando no se observen voluntarios en dos visitas consecutivas se podrá dejar de visitar ese predio.
- Después de la cosecha se elegirá la mejor ruta que deba seguir el camión que transporta el producto para evitar diseminación de la semilla.
- Celebrar contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y se destine a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial. Cuando el algodón llega a la planta despepitadora, la carga inmediatamente es pesada para saber la cantidad de algodón entregada por cada productor, que debe llegar con un máximo del 11% de humedad, el algodón en este estado se le llama algodón hueso, éste a través de tuberías llega a la desmotadora, las cuales son alimentadas por tornillos sin fin, la maquina desmotadora separa casi completamente la fibra de la semilla, luego la fibra es compactada para formar pacas, de un peso que varia entre los 181.81 y 227.27 Kg., luego se clasifican las fibras de las pacas de acuerdo a la calidad (en base a la elasticidad, grosor y largo de la fibra), el rendimiento para convertir algodón hueso en algodón pluma, anda alrededor del 33%. La semilla está recubierta por una vellosidad llamada borra, la semilla con borra es vendida para consumo animal, cuando la borra es separada de la almendra, la borra es utilizada para la elaboración de colchones, almohadas, etc., y de la almendra se extrae el aceite comestible. El despepite se compromete a destinar la semilla a estos usos y no a su resiembra, almacenamiento, ni comercialización como semilla.



VI.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.

Para monitorear la presencia de plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se utilizan tiras reactivas (QuickStix® Strips) en muestras de hojas. La utilización de tiras reactivas permite, al igual que en el caso de otros cultivos GM, identificar de forma rápida y confiable al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. El método identifica en forma específica las proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 y CP4 EPSPS.

EnviroLogix. QuickStix™ Combo Comb Kit for Cry1Ac/Cry2A/Roundup Ready® AS 046 STC. Catalog Number: AS 046 STC.

Este método está disponible públicamente y puede ser consultado en la siguiente dirección:

http://www.envirologix.com/artman/publish/cat_index_5.shtml

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 o de la cosecha, 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 de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera.

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 BG2F fuera de los predios autorizados. Para ello, se firmarán licencias de uso de la tecnología con agricultores cooperantes. De ser necesario, se efectuará un monitoreo en zonas vecinas a la de liberación del algodón BG2F y se utilizarán tiras reactivas para detectar el evento BG2F en muestras de hojas.



Deberá haber 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.

Se celebrarán contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y sea de este modo destinada a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial

El manejo en campo del algodón BG2F será siempre realizado por personal capacitado y experimentado en el manejo de este tipo de material, incluyendo al agricultor cooperante.

El acceso a los lotes donde se sembrará el algodón BG2F estará restringido solo a personal autorizado por la compañía para tal fin y personal del agricultor cooperante.

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 material una vez que el algodón se encuentra sembrado, 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.
- El camión que transporta la cosecha, en caso de poder elegir entre diferentes rutas de transporte, se elegirán las que se encuentren en mejores condiciones para evitar diseminación.



- Celebrar contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y se destine a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial.
- 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 BG2F y procediendo a su destrucción por medios químicos o manuales.

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 a la Dirección General de Sanidad Vegetal y a las autoridades legales competentes.

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

Las medidas y procedimientos de bioseguridad 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, como resultado de un monitoreo aleatorio de las zonas algodonerías, predios sembrados con algodón BG2F, los cuales no son parte del padrón de agricultores cooperantes, quienes han firmado una licencia de uso de la tecnología de Bayer de México S.A. de C.V., 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 a la Dirección General de Sanidad Vegetal.

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 BG2F está bien caracterizada. Existe el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V. de liberar el algodón BG2F sólo dentro del polígono de liberación propuesto en esta solicitud. Lo anterior se mantendrá controlado con la ubicación de las coordenadas GPS de los predios de los agricultores cooperantes. Además,



se informará de dicha liberación a los agricultores vecinos de los predios en los que se sembrará el algodón BG2F. Todo 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. Análisis de riesgo en países como Australia y los Estados Unidos de América han permitido concluir que el algodón BG2F no posee algún riesgo para el ambiente, ni para la flora o la fauna. El algodón BG2F sólo se distingue de su contraparte convencional por la tolerancia que tiene al herbicida glifosato y resistencia a insectos, atributo conferido por la expresión de las proteínas CP4 EPSPS, Cry1Ac y Cry2Ab, cuya seguridad ha sido ampliamente demostrada.

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

Los agricultores tienen ya establecidos sus canales de comercialización. Por lo tanto, la fibra será comercializada de acuerdo a como lo consideren más adecuado para ellos. Lo mismo sucederá en el caso de la semilla. Como ya se ha mencionado, se firmarán contratos para evitar la desviación de la semilla que resulte en la cosecha del algodón BG2F.

Se celebrarán contratos con empresas despepitadoras para garantizar que la semilla cosechada no sea enajenada a terceros y se destine a su procesamiento industrial. Los despepites podrán ser monitoreados por representantes de Bayer para asegurar que la semilla vaya a uso industrial.

Tal como se menciona anteriormente la cosecha del algodón es procesada en las despepitadoras, donde se hace la separación de la fibra de la semilla con borra.

La semilla está recubierta por una vellosidad llamada borra, la semilla con borra es vendida para consumo animal, cuando la borra es separada de la almendra, la borra es utilizado para la elaboración de colchones, almohadas, etc., y de la almendra se extrae el aceite comestible. El despepite se compromete a destinar la semilla a estos usos y no a su resiembra, almacenamiento, ni comercialización como semilla.

Los residuos de la cosecha del algodón en campo son destruidos por métodos mecánicos. De cualquier manera y como se ha mencionado anteriormente, el algodón sólo se propaga



por medio de la semilla y en cualquier caso se efectuará un monitoreo de plantas voluntarias con el evento BG2F en los ciclos agrícolas subsecuentes.

IV.b.7 Medidas y procedimientos de contingencia, que se llevarán en caso de que ocurra una liberación accidental del OGM

Medidas en caso de una liberación accidental durante el transporte.

- a) En caso de derrame accidental de semilla durante el transporte, la empresa transportadora tendrá indicaciones para que se recoja la semilla derramada y mantengan el material bajo resguardo hasta que Bayer de México S.A. de C.V. sea notificada.
- b) Notificar a todas las personas autorizadas y con capacidad de decisión con relación al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.
- c) Si es posible, hacer todos los esfuerzos por recuperar el material liberado y destruirlo inmediatamente.
- d) Se identifica plenamente el sitio del accidente y se establece 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).
- e) Se debe notificar a la autoridad competente acerca de la liberación accidental.
- f) Se deben documentar exhaustivamente todas las acciones anteriores incluyendo la hora y la fecha de cada acción.
- g) Informar a la autoridad competente sobre el plan de acción que se implementará.

Medidas en caso de una liberación accidental.

- h) Para detectar la dispersión no intencional del OGM más allá de los sitios de liberación permitidos o de las áreas designadas para su uso, se realizan de manera rutinaria las siguientes acciones:
- i) Los predios de algodón serán inspeccionados en un radio de 300 m al final del periodo de siembra en busca de plantas voluntarias con la característica Bollgard II®/Solución Faena Flex® mediante el análisis de plantas con tiras reactivas específicas para detectar las proteínas las proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 y CP4 EPSPS y al ser confirmada se procederá a su eliminación.



- j) Para monitorear la presencia de plantas de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se utilizan tiras reactivas (QuickStix® Strips) en muestras de hojas. La utilización de tiras reactivas permite, al igual que en el caso de otros cultivos GM, identificar de forma rápida y confiable al algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. El método identifica en forma específica las proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 y CP4 EPSPS.

EnviroLogix. QuickStix™ Combo Comb Kit for Cry1Ac/Cry2Ab/Roundup Ready® AS 046 STC. Catalog Number: AS 046 STC.

Este método está disponible públicamente y puede ser consultado en la siguiente dirección:

http://www.envirologix.com/artman/publish/cat_index_5.shtml

La cosecha y los residuos de los experimentos de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® serán destruidos en el sitio experimental mediante incineración, al término de las evaluaciones.

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 Bollgard II® y algodón Solución Faena Flex® 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 2004 y la Food and Drug Administration aprobó para consumo humano y animal en 2005 el algodón Solución Faena Flex®, se anexan los documentos de aprobación en la carpeta de referencias.
- En USA, the Animal and Plant Health Inspection Service (US Department of Agriculture) aprobó la siembra comercial del algodón Bollgard II® en 2002, se anexan los documentos de aprobación en la carpeta de referencias ([USDA notification and FDA notification](#)).



- El algodón Roundup Ready Flex®/Bollgard II® es aprobado en el marco actual del sistema de regulación de los EE. UU como un OGM apilado (stacked) ya que este es producto del cruzamiento convencional de dos OGMs que tienen características no vinculadas, y que ya han sido aprobados en esa nación.
- También pueden consultarse directamente en la página Web de dichas oficinas de gobierno de USA.
- En USA the US Department of Agriculture and the Food and Drug Administration aprobaron la siembra comercial y su uso para consumo humano del algodón Roundup Ready® en 1995 y en 2002 para el caso de Bollgard II®.
- En Canadá the Canadian Food Inspection Agency and Health Canada aprobó la liberación comercial y para consumo humano del algodón Roundup Ready® en 1996 y en 2003 el uso de Bollgard II® para livestock y alimentación humana.
- En Japón también se aprobó el algodón Roundup Ready® para liberación comercial en 1997 y para consumo humano y animal en 1998; Bollgard II® se aprobó para consumo humano en 2002 y consumo animal en 2003 por the Japanese Ministries of Agriculture, Forestry and Fisheries, y Health, Labour and Welfare.
- En Filipinas se aprobó el uso del algodón Roundup Ready® para consumo humano y animal en 2003.
- En Argentina se aprobó la liberación comercial del algodón Roundup Ready® en 1999 y para consumo humano y stockfeed en 2000 y 2001, respectivamente.

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

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® se obtuvo mediante cruzamiento convencional de los eventos Bollgard®II y Solución Faena Flex® (MON 15985 y MON 88913). La ausencia de cambios en la capacidad competitiva de los eventos de los cuales se deriva el Bollgard®II/Solución Faena Flex®, el diferente mecanismo y ubicación de las proteínas conferidas no sugieren la generación de problemas de maleza o plaga.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® combinan la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ac y Cry2Ab altamente específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodón: 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) (Dankocsik *et al.* 1990; Macintosh *et al.*, 1990; Widner & Whiteley, 1989).

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. Al igual que la toxina Cry1Ac que expresan los algodones Bollgard®, la toxina Cry2Ab controla al gusano bellotero y rosado, sin embargo, estudios realizados por Monsanto han confirmado que existen diferencias en los mecanismos insecticidas de estas proteínas. Las pruebas realizadas *in vitro* e *in planta* indican que la combinación de ambas proteínas incrementa la actividad insecticida observada para cada proteína individual. Este incremento en la actividad insecticida sugiere que estas toxinas actúan de manera aditiva. Existen también diferencias entre las proteínas respecto a su nivel de actividad en las diferentes especies de plagas. La proteína Cry2Ab tiene mayor eficacia contra el gusano bellotero (*H. zea*) y cogollero (*S. frugiperda*) que Cry1Ac, pero esta última es más eficaz contra el gusano tabacalero (*H. virescens*) y rosado (*P. gossypiella*). Por lo anterior, las variedades de algodón Bollgard® II que expresan las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un mejor espectro de control al que ejerce Bollgard® solamente y, por lo tanto, reducen el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo con ambas toxinas.

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contienen dos copias del gen *epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. El gen *cp4 epsps* codifica una enzima (CP4 EPSPS) que es tolerante a la inhibición por el herbicida glifosato (Padgett *et al.*, 1993), y se ha incorporado a las plantas de algodón para conferir tolerancia a las aplicaciones foliares de glifosato. La enzima EPSPS nativa del algodón es susceptible al herbicida glifosato.

En las plantas el gen *epsps* nativo (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) codifica para una enzima (EPSPS) crucial en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina), componentes esenciales de las proteínas. Los herbicidas agrícolas de la familia Faena® actúan inhibiendo la actividad de la enzima EPSPS de las plantas, bloqueando la biosíntesis de aminoácidos aromáticos impidiendo así la sobrevivencia de las células vegetales



(Steinrucken & Amrhein 1980). En las plantas genéticamente modificadas que contengan el gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* la biosíntesis de aminoácidos aromáticos no es bloqueada por la presencia de herbicidas agrícolas de la familia Faena y las plantas no mueren cuando se aplica sobre ellas este herbicida.

El herbicida glifosato es usado para el control de un amplio espectro de maleza anual y perenne en aplicación foliar. Este herbicida no tiene actividad residual, ni se lixivia en el perfil del suelo; su molécula es degradada microbiológicamente en productos naturales como agua (H₂O), dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno (N) y fósforo (P) en el término de 60 a 90 días y tiene una baja toxicidad para mamíferos, aves y peces (US EPA, 1993; WHO, 1994; Giesy *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000). Adicionalmente, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos, así como la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en México, han establecido límites máximos de residuos (LMR) para el glifosato de Monsanto en más de 140 cultivos anuales y perennes incluyendo el algodón.

Dado que las proteínas EPSPS se encuentran de forma natural entre plantas y microorganismos de la naturaleza, y que no son tóxicas para peces, aves, insectos, mamíferos y otras especies y que la exposición a estas especies es bastante improbable, debido a sus preferencias alimentarias, no se espera que se produzca ningún efecto adverso sobre la fauna silvestre tras la liberación al ambiente de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. Además, los datos agronómicos y de composición obtenidos del algodón Solución Faena Flex® apoyan la afirmación de que el impacto sobre la biodiversidad del algodón modificado será equivalente al del algodón convencional.

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

Como se describe en el inciso anterior, el análisis efectuado en los Estados Unidos de América ha concluido que la liberación del algodón BG2F no representa riesgo alguno para el ambiente, ni para la flora o la fauna.



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

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).

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).

Cuadro 8. Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados

	% of total reduction in environmental impact: developed countries	% of total reduction in environmental impact: developing countries
GM HT soybeans	53	47
GM IR maize	92	8
GM HT maize	99	1
GM IR cotton	15	85
GM HT cotton	99	1
GM HT canola	100	0
Total	46	54
Developing countries include all countries in South America		

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.



La adopción de algodón biotecnológico en el mundo durante 2006 alcanzó una superficie total de 13.4 millones de hectáreas equivalente al 38% del área global destinada a este cultivo, en donde sobresalen por su superficie sembrada los países de la India, Estados Unidos, Argentina y China (James, 2006). En el caso de México la adopción de algodón biotecnológico alcanzó las 54,750 ha, lo que representó el 46% de la superficie total destinada al cultivo durante 2006 sobresaliendo las regiones de la Comarca Lagunera y Chihuahua.

En el caso de México, se cuenta con la información generada de la evaluación agronómica de las variedades de algodón Bollgard® durante el periodo 1996-2006. La información acumulada en este periodo indica que se ha obtenido una reducción importante en el uso de insecticidas para la producción de algodón de al menos 454,000 L de producto formulado. La reducción en las aplicaciones de insecticidas contribuye a disminuir su efecto negativo en las poblaciones de insectos benéficos y otros organismos no blanco.

En el estudio de Traxler y Godoy-Ávila (2004) realizado en La Laguna se analizaron los aspectos económicos y ambientales de la tecnología Bollgard® en nuestro país. Los resultados del estudio indican que el algodón Bollgard® es una importante herramienta para la producción de algodón contribuyendo a la reducción en el uso de insecticidas al menos en un 50% con relación al algodón convencional y generando importantes beneficios económicos para los agricultores. En este estudio los investigadores determinaron que aproximadamente el 85% de los beneficios generados por la utilización de la tecnología fueron para los agricultores.

Los agricultores que utilizaron la tecnología Bollgard® han obtenido un beneficio económico promedio de \$2,950/ha superior al obtenido por los agricultores que sembraron algodón convencional. El algodón Bollgard® ha contribuido a elevar la competitividad del cultivo en México y ha disminuido el riesgo de fallas en el cultivo por el ataque de insectos. Adicionalmente, el uso de la tecnología Bollgard® ha contribuido significativamente al éxito de la campaña binacional México-Estados Unidos para la erradicación del gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders) (Traxler y Godoy-Ávila, 2004).

Los resultados reportados en el estudio de Traxler y Godoy-Ávila (2004) son consistentes con los obtenidos en otras regiones algodonerías del mundo. En Argentina, Qaim y de Janvry (2003) reportan una reducción en las aplicaciones de insecticidas de 50% con relación al algodón



convencional, principalmente de insecticidas altamente tóxicos, con el beneficio correspondiente para el ambiente y la salud de los agricultores. Adicionalmente los agricultores que adoptaron la tecnología Bollgard® obtuvieron un rendimiento significativamente superior al obtenido en algodón convencional. La estimación econométrica realizada demuestra que se necesitarían duplicar las aplicaciones de insecticidas en algodón convencional para poder alcanzar los niveles de rendimiento por hectárea obtenidos en el algodón Bollgard®.

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

Se anexa a la presente solicitud y en la carpeta de referencias una copia de la notificación del USDA en la que se determina que el algodón B2F no es ya un evento regulado

- [Non-regulated status for Roundup Ready Flex Cotton](#)
- [Non-regulated status for Bollgard II Cotton](#)

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

Manejo de Malezas

Las especies de maleza que se presentan en el cultivo de algodón compiten por los escasos recursos de nutrientes, luz y espacio, y por lo general, se adaptan mejor a las condiciones de crecimiento existentes que el cultivo plantado.

El algodón, frente a las malas hierbas tiene muchas desventajas como especie agronómica: 1) su establecimiento es más lento que muchas especies de maleza; 2) depende en mayor grado de temperaturas óptimas del suelo (27 a 32°C) para una rápida germinación; y 3) utiliza el agua, los nutrientes y la energía con menos eficacia que muchas de las malezas llamadas C₄ (Frisbie y El-Zik, 1989).



Ante tales situaciones, el algodnero es un mal competidor de las malezas, y este bajo grado de competitividad se agrava a menudo por su elevada susceptibilidad a las enfermedades y al ataque de insectos.

En la mayoría de los casos, los productores de algodnero se resisten a usar herbicidas para el control de malezas debido tanto al desconocimiento que de estos productos se tiene, como al riesgo que su uso representa; por ello, la siembra de variedades que escapen al daño de herbicidas puede ser una excelente herramienta que elimine el riesgo de daño al cultivo.

Las principales malezas que atacan al cultivo de algodnero en todo el mundo forman un grupo de 32 especies correspondientes a 14 familias (Frisbie y El-Zik, 1989).

El algodón es muy susceptible a la competencia de las malezas y casi el 30% de la producción mundial se pierde debido a sus efectos adversos. Si el cultivo no se desyerba regularmente las pérdidas pueden alcanzar hasta un 90% (Beltrao *et al.*, 1974).

El algodnero, como todas las plantas, no se ve afectado por la competencia de la maleza mientras las plántulas dependen del suministro del endospermo, pero una vez agotado éste, la competencia puede ser severa generalmente durante seis a ocho semanas (Frisbie y El-Zik, 1989). En la Comarca Lagunera es necesario mantener el cultivo libre de malas hierbas hasta los 60 o 70 días después de nacido (SAGAR-INIA, 1980), mientras que en la región agrícola del Estado de Chihuahua el período crítico de competencia comprende entre los 30 y 75 días después de la emergencia del cultivo (SARH, 1984). Lo anterior indica que durante dicho período debe ponerse especial atención al manejo de malas hierbas, ya que de no hacerlo se ven reducidos drásticamente los rendimientos. Pasando este período, y una vez que el terreno es cubierto completamente por una bóveda vegetal de plantas vigorosas, el algodnero puede llegar a ser un fuerte competidor, en especial en lo que se refiere a la humedad, y es menos afectado por el crecimiento de las malas hierbas. En esta etapa, el control de las plagas de insectos y de las enfermedades puede llegar a ser un problema más importante que el control de las malas hierbas.

Por su parte, los daños indirectos se refieren a aquellos daños que no afectan directamente la expresión del rendimiento, pero que de alguna manera incrementan la posibilidad de que otro



problema del manejo del cultivo se haga presente. Los daños indirectos más importantes incluyen dificultad en la cosecha, baja calidad de la fibra debido al manchado y contenido de basura en la misma, y fuentes de reservorio de insectos plaga y patógenos causantes de muchas enfermedades en el cultivo.

Algunas malezas que hospedan organismos dañinos al algodón incluyen a *Sida* spp. como hospedante de virus; *Amaranthus* spp hospeda a *Rhizoctonia*, uno de los principales agentes de la podredumbre de plántulas; *Solanum eleagnifolium*, *S. carolinense*, *Sida spinosa*, *Abutilon theophrasti*, *Portulaca oleracea*, *Ipomoea purpurea* y *Amaranthus retroflexus* albergan los hongos *Verticillium albo-atrum* y *Phymatotrichum omnivorum*. *Solanum eleagnifolium*, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus retroflexus* y *Datura stramonium* mas otras malezas, son hospedantes del nemátodo de la podredumbre de la raíz *Meloidogine incognita* (Frisbie y El-Zik, 1989).

Otras malezas son hospedantes de plagas de insectos: *Abutilum asiaticum* es hospedante de *Earias insulana* en Madagascar; *Malachrae* spp y otras hierbas malváceas son hospedantes de *Dysdercus* spp; *Amaranthus* spp, *Physallis peruviana*, *Portulaca oleracea*, *Nicandra physaloides*, *Eleusine indica*, *Emilista tora* y *Sida* spp. son hospedantes de *Spodoptera frugiperda*, *Prodenia sunia* y *Prorachia daria* en el Perú y Colombia; *Hibiscus rosa-sinensis* es hospedante de *Anthonomus vestitus*; siete de las malezas latifoliadas enumeradas albergan el *Heliiothis* en los Estados Unidos, y la *Ipomoea cordofana* alberga a *Bemisia tabaci* en Sudán. *Pseudatomoscelis seriatus* depende en Texas y Oklahoma de una serie de hospedantes, viviendo en la primavera en distintas malezas para después emigrar hacia el algodón, y cuando éste ha madurado, la pulguilla saltona se transfiere a *Croton* spp y otras malezas (Frisbie y El-Zik, 1989).

Para contender con dichos problemas se cuenta con métodos de control.

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.

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 algodónero (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 debe programarse a intervalos entre 14 y 18 días después del brote (Philips and Timmons 1954, citados por Muzik, 1970; NAS, 1980).

Control manual. Consiste en la utilización del azadón para controlar la maleza que se desarrolla entre las plantas de algodónero, 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.



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 mallas 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)

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.

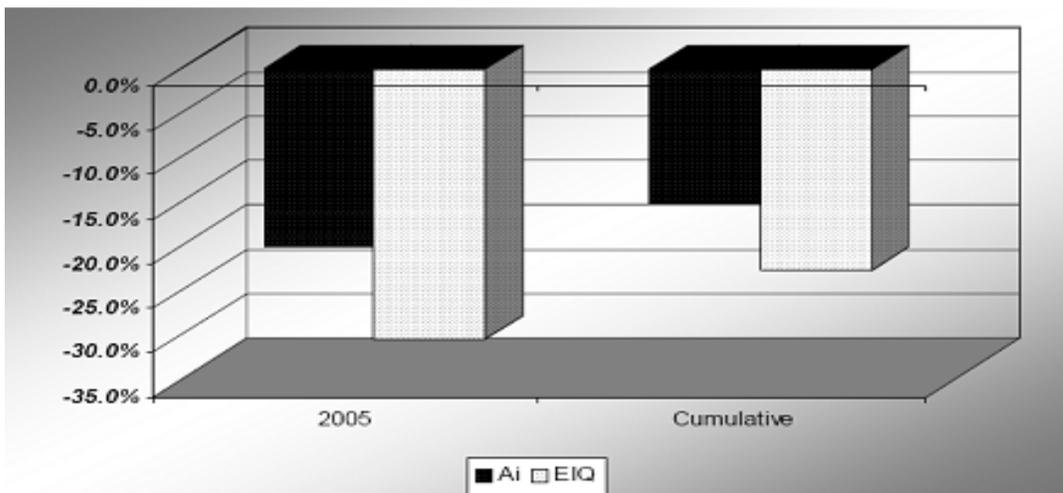
Existen varias formas de clasificar los herbicidas, incluyendo como se usan, sus propiedades químicas y su modo de acción (FAO, 1996).

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).

Lo anterior describe algunas consideraciones sobre el uso de las alternativas disponibles para contender con el problema del manejo de maleza en el cultivo del algodón. Sin embargo, al no usar las tecnologías disponibles como lo es la siembra de cultivos GM como el algodón BG2F, se está perdiendo varios beneficios como se muestra a continuación.



Cuadro 9. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a los herbicidas en los EE.UU., Australia y Sudáfrica de 1997-2005.

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 EE. UU., Australia y Sudáfrica del año 1997 a 2005.

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.

Cuadro 10. Consumo de combustible por el uso del tractor, por método de labranza

	litre/ha
Traditional cultivation: moldboard plough, disc and seed planting etc	46.65
Conservation cultivation (RT): chisel plough, disc and seed planting	28.83
No-till (fertiliser knife, seed planting plus 2 sprays: pre-plant burn down and post-emergent)	14.12

Source: Adapted from Jasa (2002) and CTIC 2004



En el siguiente cuadro 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.

Cuadro 11. Impacto de cambios en el uso de herbicidas e insecticidas por la cultivación global de los cultivos GM de 1996 a 2005

Trait	Change in volume of active ingredient used (million kg)	Change in field EIQ impact (in terms of million field EIQ/ha units)	% change in ai use in GM growing countries	% change in environmental impact in GM growing countries
GM herbicide tolerant soybeans	-51.4	-4,865	-4.1	-20.0
GM herbicide tolerant maize	-36.5	-845	-3.4	-4.0
GM herbicide tolerant cotton	-28.6	-1,166	-15.1	-22.7
GM herbicide tolerant canola	-6.3	-310	-11.1	-22.6
GM insect resistant maize	-7.0	-403	-4.1	-4.6
GM insect resistant cotton	-94.5	-4,670	-19.4	-24.3
Total	-224.3	-12,259	-6.9	-15.3

Manejo de plagas

Entre las principales plagas lepidópteras del algodón 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 precomercial 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® es totalmente compatible con los principios del manejo integrado de plagas (MIP), debido a que Bollgard® controla únicamente algunos insectos lepidópteros, por lo cual muchos insectos benéficos además de no ser afectados por la tecnología Bollgard® son beneficiados por la reducción en el uso de plaguicidas en el cultivo.

El algodón Bollgard®II evento 15985, resistente al ataque de insectos plaga, fue desarrollado a partir del algodón genéticamente modificado (GM) línea 531 que expresa la proteína *Bt* Cry1Ac. La planta de algodón 531 fue modificada genéticamente para producir una segunda proteína *Bt* con actividad insecticida frente a importantes plagas del algodón. La nueva proteína insecticida (Cry2Ab) es miembro de una familia de proteínas producidas por la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*). Las cepas de *Btk* se emplean extensivamente como bioplaguicidas en diferentes cultivos. Estas proteínas se denominan comúnmente como proteínas *Bt*, y el algodón Bollgard®II evento 15985 produce dos proteínas *Bt*, la Cry1Ac y la Cry2Ab.

La presencia en 15985 de un segundo gen *Bt* le confiere protección adicional frente a insectos plaga. Estas dos proteínas insecticidas poseen un modo de acción similar, pero interactúan con diferentes sitios receptores en el intestino de los insectos blanco, permitiendo así contar con dos líneas de protección frente al ataque de insectos plaga. La expresión de más de una proteína *Bt* en la misma planta es una estrategia útil para reducir la probabilidad de seleccionar individuos resistentes en las poblaciones de los insectos blanco.

El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® es totalmente compatible con los principios del manejo integrado de plagas y debido a que controla en forma específica algunos insectos lepidópteros su utilización representa para insectos benéficos que no son blanco de la tecnología obtener el beneficio por la reducción en la aplicación de plaguicidas requeridos para la producción de algodón.

**Cuadro 12. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodónero (CICOPLAFEST, 1998; SAGAR, 2000; PLM, 2006).**

Ingrediente Activo	Categoría Toxicológica	Grupo Químico
Acefate	Ligeramente tóxico	Organofosforado
Azinfos metílico	Altamente tóxico	Organofosforado
Betaciflutyn	Ligeramente tóxico	Piretroide
Bifentrina	Ligeramente tóxico	Piretroide
Carbarilo	Moderadamente tóxico	Carbamato
Cipermetrina	Moderadamente tóxico	Piretroide
Clorfenapir	Ligeramente tóxico	Halogenado de 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
Metomilo	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

Las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® combinan la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ac y Cry2Ab altamente específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodónero: 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) (Dankocsik *et al.* 1990; Macintosh *et al.*, 1990; Widner & Whiteley, 1989).

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. Al igual que la toxina Cry1Ac que expresan los algodones Bollgard®, la toxina Cry2Ab controla al gusano bellotero y rosado, sin embargo, estudios realizados por Monsanto han confirmado que existen diferencias en los mecanismos insecticidas de estas proteínas. Las pruebas realizadas *in vitro* e *in planta* indican que la combinación de ambas proteínas incrementa la actividad insecticida observada para cada proteína individual. Este incremento en la actividad insecticida sugiere que estas toxinas actúan de manera aditiva. Existen también diferencias entre las proteínas respecto a su nivel de actividad en las diferentes especies de plagas. La proteína Cry2Ab tiene mayor eficacia contra el gusano bellotero (*H. zea*) y cogollero (*S. frugiperda*) que Cry1Ac, pero esta última es más eficaz contra el gusano tabacalero (*H. virescens*) y rosado (*P. gossypiella*). Por lo anterior, las variedades de algodón Bollgard® II que expresan las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un mejor espectro de control al que ejerce Bollgard® solamente y, por lo tanto, reducen el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo con ambas toxinas.

Esta tecnología es compatible con el manejo integrado de plagas y reduce significativamente el uso de insecticidas contra los insectos blanco. La siembra de variedades Bollgard®II/Solución Faena Flex® exige la implementación de un programa para el manejo de la resistencia en las poblaciones de insectos blanco basado en la siembra de algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis* como áreas de refugio. En los refugios se producirán insectos sin historial de selección por las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, mismos que al dispersarse como adultos se cruzarán con insectos que eventualmente fueran seleccionados como resistentes en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®. El monitoreo de la resistencia tiene como objetivo conocer su eventual evolución y tomar a tiempo decisiones sobre el manejo del cultivo, a fin de preservar el valor y los beneficios económicos y ambientales de la tecnología Bollgard®II/Solución Faena Flex®.



Es importante tener en cuenta que los insectos son capaces de adaptarse y generar resistencia a los insecticidas. El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® no está exento de esa posibilidad por lo que para usar esta tecnología se debe dejar una porción de su superficie con algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis* que servirá como área de refugio.

Por lo que el refugio sirve para que en este algodón se produzcan insectos que no han tenido contacto con Bollgard®II/Solución Faena Flex® y que diluyan cualquier posible resistencia al cruzarse con insectos que hayan sido seleccionados en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®; los refugios sirven también como reservas naturales de insectos susceptibles para asegurar que Bollgard®II/Solución Faena Flex® mantenga su efectividad por muchos años.

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 Cry1Ac y Cry2Ab, mismos que al dispersarse como adultos se cruzarán con insectos que eventualmente fueran seleccionados como resistentes en el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.

La SAGARPA recomienda un refugio 80:20: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®, 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 Bollgard®II/Solución Faena Flex®, 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,



metomilo, 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.

El algodón Bollgard® que produce la proteína Cry1Ac se ha cultivado empleando como enfoque para el MRI la incorporación de refugios en las áreas de cultivo. En la actualidad ya se cuenta con líneas de algodón que expresan Cry2Ab, así como variedades que expresan tanto la proteína tipo Cry1Ac como la Cry2Ab.

El valor de dos proteínas insecticidas con mecanismos de acción diferentes.

La introducción de dos proteínas insecticidas con diferente mecanismo de acción para propósitos del MRI a fin de incrementar el desempeño de los cultivos no es una idea nueva. La mezcla de insecticidas convencionales, por la misma razón, se ha realizado por más de 20 años, y



estrategias similares se han empleado con herbicidas para el manejo de la resistencia en malezas. Intuitivamente parece razonable que tal estrategia permita retrasar el desarrollo de resistencia si los insectos blanco no pueden desarrollar un mecanismo que combata ambas toxinas simultáneamente. Estudios teóricos y empíricos han demostrado sin embargo que esta estrategia trabaja solamente si se cumplen ciertas condiciones (Tabashnik, 1989; Roush 1994).

Mediante modelos matemáticos Roush (1994; 1997) demostró que las mezclas de toxinas pueden retrasar de manera efectiva la aparición de resistencia a las toxinas individuales siempre que la mortalidad relativa del insecto susceptible sea mayor con dicha mezcla que la ocasionada por cada toxina individual y el carácter de resistencia sea recesivo. Para cultivos transgénicos, la estrategia más efectiva es aquella en la que ambas proteínas se expresan dentro de un mismo producto (efecto pirámide).

Para trasladar a la práctica agrícola la estrategia del uso de dos proteínas insecticidas es importante saber si las suposiciones en torno a la actividad insecticida de las toxinas individuales y la genética de la resistencia se cumplen.

La demostración de que ambas toxinas son altamente eficaces contra las plagas blanco es relativamente sencilla, y en algodón Bollgard® (Cry1Ac) se ha cumplido con este criterio respecto de la proteína Bt que se expresa. La evidencia en torno a la genética de la resistencia es necesariamente menos clara debido a la ausencia de casos de resistencia en campo a los cultivos transgénicos. La evidencia inferida de los trabajos realizados en colonias de insectos resistentes generadas a través de la combinación de selección en laboratorio y campo, sugiere que la resistencia a las proteínas Bt expresadas en cultivos transgénicos será recesiva o altamente recesiva en la naturaleza. Estudios en tres especies de lepidópteros muy diferentes entre sí apoyan esta conclusión (gusano bellotero, *Heliothis virescens*- Gould *et al.*, 1995; palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella*- Tabashnik *et al.*, 1997; y el gusano rosado *Pectinophora gossypiella*- Liu *et al.*, 1999).

Los resultados de estos modelos también dependen del grado de resistencia cruzada entre toxinas. A mayor grado de cruzamiento en la resistencia se reduce el valor del manejo de la resistencia mediante la introducción de la segunda toxina. Estudios empíricos de resistencia a



Bacillus thuringiensis indican niveles bajos pero variables, de resistencia cruzada entre proteínas Bt's estrechamente relacionadas (Gould *et al.*, 1995).

El trabajo de Kota (1999) demostró el uso de proteínas insecticidas con mecanismos nuevos en plantas de tabaco. La expresión de Cry1C en brócoli transgénico ha permitido el control de la palomilla dorso de diamante resistente a Cry1Ac (Cao *et al.* 1999).

Dando el peso relativo de estudios teóricos y la evidencia empírica es claro el valor de utilizar proteínas con diferentes propiedades insecticidas para el MRI.

VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O SE DESTINE A LA BIORREMEDIACIÓN. En caso de no contar con la autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente anexa a un escrito libre, en el que se indique el número de autorización;

El evento genético combinado Bollgard II® / solución Faena Flex® (MON-15985-7 X MON-88913-8) cuenta con la formal autorización No. COFEPRIS / CEMAR / 083300COO42332 / 2008 de fecha 22 de julio del 2008, expedida por la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

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

Se solicita el permiso para un año, tiempo que incluye desde la planeación de los estudios a realizar, importación de la semilla hasta la cosecha.



A. REFERENCIAS

Adang, M.J., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F. and Thompson, D.V. 1985. "Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*", *Gene* 36:289-300.

Anderson, K.S., and K.A. Johnson. 1990. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: Lessons from EPSP synthase. *Chem. Rev.* 90:1131-1149.

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.

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2000. GM Foods and the Consumer. Australia New Zealand Food Authority's Safety Assessment Process for Genetically Modified Foods. http://www.anzfa.gov.au/documents/pub02_00.pdf

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2001a. The Food Standards Code, Vol. 2, Standard 3.2.2; Food Safety Practices and General Requirements (Australia only). <http://www.anzfa.gov.au/foodstandards/foodstandardscodecontents/standard32.cfm>.

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2001b. Food safety: the priority classification system for food business. Lkd. <http://www.anzfa.gov.au/mediareleasespublications/publications/index.cfm>.

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2002. Draft assessment report (Full assessment - S.15) Application A436: Oil and linters derived from insect-protected cotton containing event 15985, Australia New Zealand Food Authority, Canberra, Australia, Full assessment - S.15 Application A436.

Baker, H. G., 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. *In*: H. G. Baker & G. L. Stebbins (eds.), *The Genetics of Colonizing Species*. Academic Press, New York, pp. 147-172.



Baker, J., Johnson, H. 1979. The Effect of Tillage Systems on Pesticides in Runoff from Small Watersheds. Transactions of the ASAE: 554-559.

Bairoch, A. and B. Boeckmann. 1993. "The SWISS-PROT Protein Sequence Data Bank, Recent Developments." Nucl. Acids Res. 21:3093-3096.

Bartlett, S. G., Grossman, A. R., & Chua, N. H. 1982, Methods in chloroplast molecular biology Elsevier, Amsterdam.

Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B & Schaller H (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 9: 327–336.

Benson, D., D. J. Lipman, and J. Ostell. 1993. "GenBank". Nucl. Acids Res. 21:2963-2965.

Berberich, S.A., J.E. Ream, T.L. Jackson, R. Wood, R. Stipanovic, P. Harvey, S. Patzer, and R.L. Fuchs. 1996. The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional Cottonseed. J. Agri. Food Chem. 44:365-371.

Bergmans, H. (1993). Acceptability of the use of antibiotic resistance genes as marker genes in transgenic plants. P. 106-108. In: OECD Report on the Scientific Approaches for the Assessment of Research Trials with Genetically Modified Plants. April 6-7, 1992. Jouy-en-Josas.

Bertolla, F. & Simonet, P. (1999). Horizontal gene transfer in the environment: Natural transformation as a putative process for gene transfer between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* **150**, 375-384.

Betz, F. S., Hammond, B. G. and Fuchs, R. L. 2000. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Protected Plants to Control Insect Pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32: 156-173.

Blum, S.A.E., Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1997). Mechanisms of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in non-sterile soil. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 513-521.



Brookes, Graham & Peter Barfoot. 2005. GM Crops: The Global Economic and Environmental Impact—The First Nine Years 1996–2004. *AgBioForum*, 8(2&3): 187-196.

Canadian Food and Inspection Agency. 1997. Decision Document 97-21: Determination of the Safety of Cotton Lines With Roundup Ready™ Genes (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Health and Production Division, Plant Biosafety Office.

Carpenter, J. E., & Gianessi, L.P. 2001. Agricultural biotechnology: Updated benefits estimates. Washington, DC: National Center for Food and Agricultural Policy.

Carpenter, J.E.; Felsot, Allan; Timothy Goode; Michael Hammig; David Onstad; Sujatha Sankula. 2002. Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops Council for Agricultural Science and Technology. Printed in the United States of America

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

Carter JN and Liggett MP. 1994. Acute oral toxicity and infectivity/pathogenicity to rats of EG 7841. Report No. HRC Study Report number ECO 6/942538, Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon Cambridgeshire England.

Cho, Y., Qiu, Y.L., Kuhlman, P. & Palmer, J.D. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14244-9.

Crecchio C, Stotzky G (1998) Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 463-470.

Crickmore, N., D.R. Ziegler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum and Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 807-813.



Culpepper, Alfred S.; York, Alan C. 2000. Weed Management In Glyphosate-tolerant Cotton. *The Journal of Cotton Science*(4):174 - 185.

Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. & Lee, S.B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnol.* **16**, 345-348.

Dankocsik, C., Donovan, W.P. and Jany, C.S. 1990. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *J. Mol. Microbiol.* 4 (12), 2087-2094.

Davies, J. E. & Benveniste, R. E. 1974, "Enzymes that inactivate antibiotics in transit to their targets", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 235, no. 0, pp. 130-136.

Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42: 73-91.

Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T., & Kishore, G. M. 1986. "Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 18, pp. 6873-6977.

Diggle A, Neve P & Smith FP. 2003. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance. *Weed Research*, 43(5), 371-382.

Droge, J., Puhler, A. & Selbitschka, W. (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology* **64**, 75-90.

e-CFR (Electronic Code of Federal Regulations). Title 7 - Agriculture. Subtitle B - Regulations of the Department of Agriculture. Chapter I - Agricultural Marketing Service (Standards, Inspections, Marketing Practices), Department of Agriculture. Subchapter K - Federal Seed Act. Part 201 Federal Seed Act Regulations.



English, L. and S. L. Slatin. 1992. The mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22:1-7.

EPA (US Environmental Protection Agency). 1994. Plant-pesticides; Proposed Exemption From the Requirement of a Tolerance Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic. 59 Fed. Reg. 60535.

Environmental Protection Agency (EPA) 1998. Registration Eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis* (Bt). EPA 738-R-98-004.

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.

Estes, T. L., Allen, R., Jones, R. L., Buckler, D. R., Carr, K. H., Gustafson, D. I., Gustin, C., McKee, M. J., Hornsby, A.G., & Richards, R. P. 2001. Predicted impact of transgenic crops on water quality and related ecosystems in vulnerable watersheds in the United States. Paper presented at the Soil and Water Mini-Symposium, British Crop Protection Council (BCPC) Conference, Weeds 2001. Brighton, UK.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 1995. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies, Rome, Italy, November 13-14, 1995. FAO, Rome.

FAO/WHO 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology, 29 May - 2 June 2000.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization). 2001. Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology 22 – 25 January 2001. Rome, Italy.

Fast, PG. 1981 The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges HD ed. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. New York, London, Academic Press Inc., pp 223-248.



FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Federal Register 57(104):22984-23005.

FDA (Food and Drug Administration). 1994a. Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption; Food Additives Permitted in Feed and Drinking Water of Animals; Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase II. 59 Fed. Reg. 26700.

FDA (Food and Drug Administration). 1998. Guidance for Industry: Use of Antibiotic Resistance Marker Genes in Transgenic Plants (Draft Guidance). Docket No. 98D-0340. [Online]. Available: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html> [1999, December 2].

Felsot, A. S. 2000b, "Insecticidal genes. Part 2: Human health hoopla", Agrichemical and environmental news, vol. 168, pp. 1-7.

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

Flavell, R.B., Dart, E., Fuchs, R.L. and Fraley, R.T. 1992. Selectable marker genes are safe for plants?. Bio/Technology 10:141-144.

Fraley, R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Ho&arm, and S. C. Woo. 1983. Expression of Bacterial genes in Plant Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807.

Fryxell, P. A. 1979. The Natural History of the Cotton Tribe (Malvaceae, Tribe Gossypieae). Texas A&M University Press. College Station and London. 245 pp.

Fryxell, P. A. 1984. Taxonomy and Germplasm Resources. pp. 27-57. In Kohel, R. J. and Lewis, C. F., Editors. Cotton. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. 605 pp.

Fryxell, P.A., 1992. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). Rheedea 2: 108-165.



Fuchs, R. L.; Berberich, S. A.; Serdy, F. S. 1993. Safety evaluation of genetically engineered plants and plant products: Insect resistant cotton. In *Biotechnology and Safety Assessment*; edited by John A. Thomas and Laurie Myers. Raven Press, Ltd., New York, pp. 199-212.

Fuchs, R.L. 1994. "Gene Expression and Compositional Analysis from Field-Grown Insect Resistant Cotton Tissues" (1994), Study Number 92-01-36-07, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID#43168701.

Fuchs, R. L. and Astwood, J.D. 1996. Allergenicity Assessment of Foods Derived from Genetically Modified Plants (1). In *Highlights in Food Allergy* (B. Wüthrich B. Ortolani, eds) S. Karger AG, Monographs in Allergy; 1996, Vol. 32, 105 -120) *Food Technology*, Feb. 1996, 83-88.

Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Canto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C. & Stotzky, G. (1994). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**, 119-126.

Gebhard, F. & Smalla, K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**,261-272.

Gianessi, L.P. 2005. Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 61:241-245.

Giesy, John P.; Stuart Dobson, and Keith R. Solomon. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol* 167:35-120.

Gould, F., Anderson, A., Reynolds, A., Bumgarner, L. and Moar, W. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88: 1545-1559.

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

Greaves, M.P. & Wilson, M.J. (1970). The degradation of nucleicacids and montmorillonite-nucleic acid complexes by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **2**, 257-268.

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.

Harrison, L. A., M. R. Bailey, N. W. Naylor, J. E. Ream, B. G. Hammond, D. Nida, B. L. Burnetter, T. E. Nickson, T. A. Mitsky, M. L. Taylor, R. L. Fuchs, and S. R.

<http://www.agbios.com>

Padgett. 1993. The expressed protein in glyphosatetolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.* 126(3):728-740.

Hebblethwaite, J. F. 1995. The contribution of no-till to sustainable and environmentally beneficial crop production. A global perspective. Conservation Technology Information Center, West Lafayette, Indiana.

Hernández, J.; Pacheco Covarrubias, J.; Ortíz Enriquez, J.E.; Uvalle Bueno, J.X.; Tamayo Esquer, L.M.; Contreras de la Cruz, E. 1996. Recomendaciones para el cultivo del algodón en el Estado de Chihuahua ciclo primavera - verano 1996. Campo Experimental Valle del Yaqui. INIFAP. Cd. Obregón, Son.

Hofmann, C., Vanderbruggen, H.V., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., and Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7844-7848.



Hooykaas, P.J.J. and Shilperoort, R.A. 1992. Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19: 15-38.

Infojardin: <http://www.infojardin.com/fichas/hortalizas-verdes>

International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/15010006.htm>

Jain, R., Rivera, M.C. & Lake, J.A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3801-3806.

James, C. 2006. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.

Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment. Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for MON15985 x MON88913

Jefferson, R. A., Burges, S.M., and Hirsh, D. 1986. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:8447-8451.

John, M.E., 1997. Cotton crop improvement through genetic engineering- In *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(31): 185-208

Kay, R., A C&an, M. Daly, and J. McPherson. 1987. Duplication of the CaMV 35s Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science* 236: 1299-1302.

Kay, B. D. 1995. Soil quality: Impact of tillage on the structure and tilth of soil. Pp.7–9. *Farming for a Better Environment*. Soil and Water Conservation Society, Ankeny, Iowa.

Keeling, J. W., Dotray, P. A., Osborn, T. S., Asher, B. S. 1998. Postemergence Weed Management With Roundup Ultra, Buctril And Stable In Texas High Plains Cotton. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. 1. 861 - 862.



Keeling, J. W., P. A. Dotray, T. S. Osborne, and J. D. Everitt. 2000. Weed management in Roundup Ready (glyphosate-tolerant) cotton: Conventional and conservation tillage systems. Proc Beltwide Cotton Conf 2:1477.

Kern, J. S. and M. G. Johnson. 1993. Conservation tillage impacts on national soil and atmospheric carbon levels. Soil Sci Soc Am J 57:200–210.

Klee, H. J., Muskopf, Y. M., & Gasser, C. S. 1987, "Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants", Molecular and General Genetics, vol. 210, no. 3, pp. 437-442.

Knowles, B.H. , Dow, J.A.T. 1993. The crystal d-endotoxins of Bacillus thuringiensis: models for their mechanism of action on the insect gut. Bioessays 15: 469-476.

Kolwyck, D., K. Hamilton, and R. Lirette. 2000. Protein levels in insect-protected cotton samples produced in the 1999 US field trials. Monsanto research report: MSL-16724.

Koskella J, Stotzky G (1997) Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. Applied and Environmental Microbiology 63: 3561-3568.

Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S.F., Gould, F. and Moar W.J. 1999. Overexpression of the Bacillus thuringiensis (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistance insects. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 1840-1845.

Lee, M.K., Young, B.A. and Dean, D.H. 1995. Domain III exchanges of Bacillus thuringiensis Cry1A toxins effect binding to different gypsy moth midgut receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216: 306-312.

Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvyl shikimate 5-phosphate. J. Biol. Chem. 239:1142-1150.

Levy, S.B. (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium **207**, S. 1-14, Wiley, Chichester.



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.

MacIntosh, S., Stone, T., Sims, S., Hunst, P., Greenplate, J., Marrone, P., Perlak, F., Fischhoff, D., Fuchs, R. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 56(2):258 - 266.

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

Maiti, I., Gowda, S., Kiernan, J., Ghosh, S. and Shepherd, R. "Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus full length transcript promoter containing single or double enhancer domains", 1997, *Transgenic Res.* 6,143-56

McClintock, J.T., C.R. Schaffer and R.D. Sjoblad. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science* 45:95-105.

McCloskey, W. B. 1998. Weed Management: Transgenics And New Technologies - A Weed Scientists Perspective. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. 1. 25 - 26.

McGregor, S. E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. *Agriculture Handbook No. 496*. U.S. Government Printing Office. Washington, DC.

Metcalfe, D. D., J. D. Astwood, R. Townsend, H.A. Sampson, S.L. Taylor and R.L. Fuchs. 1996b. Assessment of the Allergenic Potential of Foods Derived from Genetically Engineered Crop Plants. *Critical Rev. in Food Science and Nutrition*. 36(s):S165-S186.



Milton Poehlman, John; David Allen Sleper. 1995. Breeding field crops Fourth Edition. Iowa State University Press/Ames

Mitsky, T. 1993. "Comparative Alignment of CP4 EPSPS to Known Allergenic and Toxic Proteins Using the FASTa Algorithm". Monsanto Technical Report MSL-12820, St. Louis, MO.

Morrison, M. 1996. Do ruminal bacteria exchange genetic material? J. Dairy Sci. 79, 1476-1486.

Naylor, M. 1992. Acute oral toxicity study of Btk HD-1 tryptic core protein in albino mice. Submitted to EPA for Monsanto Company's registration for Bt corn.

Naylor, M. 1993. "Acute Oral Toxicity Study of CP4 EPSPS in Albino Mice." Monsanto Technical Report MSL-92542. St. Louis, MO.

Naylor, M. 1993a. Acute oral toxicity study of B.t.t protein in albino mice. Submitted to EPA for Monsanto Company's registration for NatureMark NewLeaf potato.

Naylor, M. 1993b. Acute oral toxicity study of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* [Cry1Ac] HD-73 protein in albino mice. Submitted to EPA for Monsanto Company's registration for Bollgard cotton.

Nielsen, K.M., van Weerelt, D.M., Berg, T.N., Bones, A.M., Hageler, A.N. & van Elsas, J.D. (1997a). Natural transformation and availability of transforming chromosomal DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1945-1952.

Nielsen, K.M., Bones, A.M. & van Elsas, J.D. (1997b). Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3972-3977.

Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K. & van Elsas, J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria, a rare event? *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 79-103.

Nielsen, K.M., Smalla, K. & van Elsas, J.D. (2000a). Natural transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 206-212.



Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000b). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1237-1242.

Novillo, C., Soto, J.Y Costa, J. 1999. Resultados en España con variedades de algodón, protegidas genéticamente contra las orugas de las cápsulas. *Bol. San. Veg. Plagas* 25:383-393

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.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 1999. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Glyphosate Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 10. Health and Safety publications (<http://www.oecd.org/ehs/>).

OGTR (The Australian Office of the Gene Technology Regulator). 2002. Australian Office of the Gene Technology Regulator issues licence for controlled release of GM cotton.

Pacheco Covarrubias, J.J. 1992. Respuesta diferencial de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) a un insecticida y su relación dosis-mortalidad, bajo condiciones del Valle del Yaqui, Son.S.Mex.E., Res XXVII Congr. Nac. Entomol. pp. 310-311.

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.

Padgett, S. R., Barry, G. F., Re, D. B., Eichholtz, D. A., Weldon, M., Kolacz, K., & Kishore, G. M. 1993. Purification, cloning and characterisation of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp.strain CP4, Monsanto Company, USA, MSL-12738.



- Padgett, S.R, C.E. Smith, Q. Khaihuynh, and G.M. Kishore. 1988. Arginine chemical modification of petunia hybrida 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, Arch. Biochem. Biophys. 266:254-262.
- Padgett, S.R., D.B. Re, C.S. Gasser, D.A. Eichholtz, R.B. Frazier, C.M. Hironaka, E.B. Levine, D.M. Shah, R.T. Fraley, and G.M. Kishore. 1991. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. Journal of Biological Chemistry 266:22364-22369.
- Paget, E., Monrozier, L.J. & Simonet, P. 1992. Adsorption of DNA on clay minerals: Protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* 97, 31-40.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. & Teuber, M. (1997). Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389, 801-802.
- Palm, C.J., R.J. Seidler, K.K. Donegan, and D. Harris. 1993. Transgenic plant pesticides: Fate and Persistence in soil. *Plant Physiol. Suppl.* 102, 166.
- Palm C.J, Donegan KK, Siedler RJ. 1994. Persistence in soil of transgenic plant-produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 1258-1262.
- Palm C.J, Schaller DL, Donegan KK, Seidler RJ. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1258-1262.
- Palomo Gil, Arturo. 1996. Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia Páginas* 359-369. Academia Mexicana de Ciencias. México, D.F.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. & Teuber, M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389, 801-802.
- Pietramellar, G., Dal Canto, L., Vettori, C., Gallori, E. & Nannipieri, P. (1997). Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of DNA bound on clay minerals. *Soil Biol. Biochem.* 29, 55-61.



PLM. 2006. Diccionario de especialidades agroquímicas. 16 Edición. Thomson PLM. México, D.F.

Quiñones-Pando, F.C.; Galván-Lamas, R.; Báez-Iracheta, F. 2000. Tecnología de producción de algodón en la región centro sur del estado de Chihuahua. Centro de Investigación Regional Norte-Centro. INIFAP-SAGAR. Cd. Delicias, Chih. México.

Reicosky, D. C. 1995. Impact of tillage on soil as a carbon sink. In Farming for a Better Environment. Soil and Water Conservation Society, Ankeny, Iowa.

Reicosky, D. C. and M. J. Lindstrom. 1995. Impact of fall tillage on short-term carbon dioxide flux. Pp. 177–187. In R. Lal, J. Kimble, E. Levine, and B. A. Stewart (eds.). Soils and Global Change. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.

Rissler, J. & Mellon, M. (1993). Perils amidst the promise. Ecological risks of transgenic crops in a global market. Union of Concerned Scientists, Cambridge, MA.

Robertson, H.M. & Lampe, D.J. (1995). Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between *Diptera* and *Neuroptera*. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 850-862.

Ronald E. Hileman and James D. Astwood. Amendment to MSL-16095: Bioinformatics Analysis of Insect Protection Protein 2 (IPP2) Sequence Utilizing Toxin and Public Domani Genetic Databases. Report No. MSL-16710

Ronald E. Hileman and James D. Astwood. Bioinformatics Analysis of Insect Protection Protein 2 (IPP2) Sequence Utilizing an Allergen Database. Report No. MSL-16094

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.

Roush, R.T. 1997. Managing resistance to transgenic crops. In *Advances in insect control: the role of transgenic plants* (eds. Carozzi, N. and Koziel, M.) 271-294 (Taylor and Francis, London).



Ruiz-Corral, J.A.; Medina-García, G.; Ortiz-Trejo, C.; Martínez-Parra, R.; González Acuña, I.J.; Flores-López, H.; Byerly-Murphy, K.F. 1999. Requerimientos agroecológicos de cultivos. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, INIFAP, SAGAR. Guadalajara, Jal., México.

SAGAR. 2000. Guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola. SAGAR. México, D.F.

Salgado Sosa, Ernesto. 1996. Nuevas tecnologías para producir algodón en el Sur de Tamaulipas. Campo Experimental Sur de Tamaulipas. INIFAP.

Sanger M, Daubert S and Goodman RM. 1990. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus – comparison with the analogous-35s promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol Biol* 14: 433 - 443.

Salyers, A. (1997a). Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 8-16. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.

Salyers, A. (1997b). Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 43-57. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.

Salyers, A. (1997c). Genetically Engineered Foods: Safety Issues Associated with Antibiotic Resistance Genes. A case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: Genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe. pp. 1-23.

Schluter, K. Futterer, J. & Potrykus, I. (1995). Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs, if at all, at an extremely low frequency. *Biotechnology* **13**, 1094-1098.

Schuler, M. A., E. S. Schmitt, and R. N. Beachy. 1982. Closely related families of genes code for Alpha and Alpha Prime subunits of the soybean 7s storage protein complex. *Nucl. Acids Res.* 10:8225-8244.



- Schulz, A., A. Kruper and N. Amhein. 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiol. Lett.* 28:297-301.
- Serdy, F.S.; Ream, J.E. and Fuchs, R. 1994. Petition for determination of non-regulated status: Bollgard™ cotton line 531 (*Gossyium hirsutum* L.) with the gen form *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Monsanto Company #94-142.
- Smalla, K. van Overbeek, L.S., Pukall, R. & van Elsas, J.D. (1993). Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13, 47-58.
- Solomon, J.M. & Grossman, A.D. (1996). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.* 12, 150-155.
- Southern, E.M. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Spencer TM, Orozco EM, and Doyle RM (1996) Petition for determination of non-regulated status: insect protected corn (*Zea mays* L.) with Cry1Ac gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. DEKALB Genetics Corporation. USDA.
- Stallings, W.C., S.S.Abdel-Meguid, L.W. LIM, H. Shieh, H.E. Dayringer, N.K. Leimgruber, R.A. Stegeman, K.S.Anderson, J.A. Sikorski, S.R. Padgett and G.M. Kishore. 1991. Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5046-5050.
- Steinrucken, H. C. & Amrhein, N. 1980, "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 94, no. 4, pp. 1207-1212.
- Tabashnik, B.E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence, and recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.



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

Tabashnik, B.E., Malvar, T., Liu, Y.-B., Finson, N., Borthakur, D., Shin, B.S., Park, S.H., Masson, L., Maagd, R.A. and Bosch, D. 1996. Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2839-2844.

Tabashnik, B.E., Liu, Y.-B., Malvar, T., Heckel, D.G., Mason L., Ballester, V., Granero, F., Mensura, J.L. and Ferre, J. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12780-12785.

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. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 12, 980-12, 984.

Talipov, Ferdinand S.; Salgado Uriostegui, F.; Catalan Heverastico, C.; Domínguez Marquez, V.; Bahena Lagunas, M. 1995. El cultivo del algodón y su mejoramiento genético en el estado de Guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero. Dirección de Investigación Científica.

Tapp, H., L.Calamai, L. and G. Stotzky. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biol Biochem.* 26:663-679.

Tapp, H., and G. Stotzky. 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1786-1790.

Tapp H, Stotzky G. 1998. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1786-1790.



Taylor, S. L. & Lehrer, S. B. 1996, "Principles and characteristics of food allergens", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 36, no. Suppl, p. S91-S118.

Tebbe, C.C. & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2657-2665.

Tempe, J. & Schell, J. *In: Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides*, A.B. Legocki, Ed. (Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 1977) p.416.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis, 2000. *Nature*, 408 (6814): 796-815.

Thomson, J. 2000. Gene transfer: Mechanisms and Food Safety Risks. Topic 11. Biotech 00/13. Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. 29 May-2 June, 2000. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Traxler, G. and Godoy-Avila, S. 2004. Transgenic cotton in Mexico. *AgBioForum*, 7(1&2): 57-62.

Trolinder, N. L. and J.R. Goodin. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*. 6:231-234.

Tschape, H. (1994). The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. *FEMS Microbiology Ecology* **15**, 23-32.

Umbeck, P., G. Johnson, K. Barton, and W. Swain. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology*. 5:263-266.

Ulloa, M.; Stewart, J.McD.; Garcia-C, E.A.; Godoy-A., S; Gaytan-M, A.; and Acosta N., S.; 2006. Cotton genetics resources in the western states of Mexico: *in situ* conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation. *Genetics Resources and Crop Evolution* (2006) 53: 653 - 668.



Umbeck, P. F., Barton, K. A., Nordheim, E. V., McCarty, J. C., Parrott, W. L., and Jenkins, J. N. 1991. Degree of Pollen Dispersal by Insects from a Field Test of Genetically Engineered Cotton. *J. Econ. Entomology* 84:1943-1991.

USDA. 1995. Availability of Determination of Non-regulated status for genetically engineered cotton. *Federal Register* 60(134):36096-36097.

US Environmental Protection Agency (EPA). 1993. Reregistration Eligibility Decision Document. Glyphosate. List A case 0178. Office of Pesticide Programs. Especial review and Reregistration Division.

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 Rie J, Jansens S, Höfte H, Degheele D, & Van Mellaert H (1989), Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur J Biochem*, 186: 239-247.

Veal, D.A., Stokes, H.W. & Daggard, G. 1992. Genetic exchange in natural microbial communities. *Adv. Microb. Ecol.* **12**, 383-430.

Venkateswerlu, G. and G. Stotzky. 1992. Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiol.* 25:225-233.

Viñuela, E. y del Estal, P. 1999. Efectos secundarios de los plaguicidas en enemigos naturales de algodón y maíz en España. *Revisión Bibliográfica* 11 pp. Datos no publicados.

Welch, A. K., Rahn, P. R., Voth, R. D., Mills, J. A., Shumway, C. R. 1997. Evaluation Of Preplant And Preemergence Herbicides In Roundup Ready® Cotton. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference.* 1. 784 - 785.

Wellington, E.M.H. & van Elsas, J.D. (Eds.) (1992). *Genetic Interactions among Microorganisms in the Natural Environment.* Pergamon Press. Oxford.



Wendel, J.F., 1989. New World cottons contain Old World cytoplasm. Proc. Nat. Acad. Scie. USA 86: 4132-4136.

WHO (World Health Organization). 1994. Environmental Health Criteria for Glyphosate. International Programme on Chemical Safety. Geneva.

WHO (World Health Organization). 1999. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 217: *Bacillus thuringiensis*. Geneva.

Widner, W.R. and Whiteley, H.R. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. 171 (2), 965-974.

Widmer, F., R.J. Seidler, L.S. Watrud, 1996: Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. Mol. Ecol. 5, 603-613.

Williams, Gary M.; Robert Kroes, and Ian C. Munro. 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup® and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31, 117–165.

Witte, W. (1997). Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium **207**, S. 61-75, Wiley, Chichester.

Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**, 996-997.

Yu, L., R.E. Berry and B.A. Croft. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae). J. Econ. Entomol. 90(1):113-118.



ANEXO 1. 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 340, 000 Kg. de semilla de algodón BG2F a partir del 1 de abril de 2012 con el propósito de tener la semilla lista para el inicio de la siembra a partir del 15 de abril de 2012 en las regiones algodonerías del estado de Chihuahua.

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 Cd. 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.

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 el almacén regional de Bayer de México S.A. de C.V.; y de donde, será entonces entregada a los distribuidores y agricultores que la hayan adquirido. Los Campos de producción de los productores cooperantes que adquieran la semilla serán los destinos finales del material.

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.



ANEXO 2: PROTOCOLO

EVALUACIÓN DE LOS BENEFICIOS DE LA TECNOLOGÍA BOLLGARD II®/FLEX® EN EL CICLO AGRÍCOLA P-V 2012 EN CHIHUAHUA

El algodón genéticamente modificado con la tecnología Bollgard II ®/Solución Faena Flex® (B2F) es resistente al ataque de insectos lepidópteros como los gusanos bellotero (*Helicoverpa zea*), tabacalero (*Heliothis virescens*) y rosado (*Pectinophora gossypiella*) y posee tolerancia al herbicida glifosato (nombre comercial FAENA), lo cual permite la aplicación no selectiva de este herbicida para el control de la maleza. Esta tecnología se ha incorporado a las variedades de Bayer CropScience y para este ciclo agrícola se evaluarán los beneficios que aporta en el cultivo del algodón en las zonas algodonerías del estado de Chihuahua.

OBJETIVOS

- A. Realizar un muestreo de los gusanos bellotero, tabacalero y rosado para determinar la eficacia de los transgenes que le confieren resistencia al algodón Bollgard II ®/Solución Faena Flex® a estos insectos lepidópteros.
- B. Desarrollar un estudio de dinámica poblacional de maleza presente en el sitio de liberación (predio).
- C. Efectuar un análisis costo-beneficio total sobre el proceso de producción del algodón Bollgard II ®/Solución Faena Flex® en el cual se compare el control de las plagas, gusano bellotero, gusano rosado y gusano tabacalero, así como el control del complejo de maleza que lo atacan, contra una producción estándar de algodón convencional.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación

El experimento se establecerá en los predios de los agricultores del Estado de Chihuahua en coordinación con un investigador de un centro de investigación reconocido.

Tamaño de la muestra

Se seleccionará una muestra representativa de la zona de liberación del algodón B2F. En esa muestra se levantará la información descrita en el apartado variables a evaluar.



Cultivo y variedades

El cultivo del algodón con una o más variedades mejoradas genéticamente con el evento B2F. El agricultor escogerá la variedad de su preferencia con el evento B2F.

Para el análisis de costo beneficio, el investigador deberá tomar datos del testigo comercial que el agricultor tenga en este mismo predio, o de no tenerlo deberá tomar los datos de un predio cercano para establecer comparaciones con el sistema de control de insectos lepidópteros y de maleza convencional.

Fecha de aplicación del herbicida glifosato

El investigador deberá asesorar las dos o tres aplicaciones según se requieran del herbicida glifosato (nombre comercial FAENA) y registrará las fechas de aplicación.

VARIABLES A EVALUAR

Monitoreo de los gusanos bellotero tabacalero y rosado

MUESTREO INTEGRAL

1. **Muestreo de carga:** se toman 5 metros lineales por predio, distribuidos en un arreglo de cinco de oros. En cada punto de muestreo (de un metro lineal) se registra el número de plantas y se cortan todas las fructificaciones (cuadros, flores y bellotas), colocándolas en una bolsa de papel previamente etiquetada con la localidad y fecha de muestreo. Posteriormente se cuantifica la carga de las plantas separándolas por edades (cuadros, flores, bellotas chicas, bellotas medianas, bellotas grandes y capullos). Es muy importante contar el número de cicatrices de abscisión para ver los efectos de daño de picudo y gusano bellotero. Se obtienen promedios de fructificaciones por metro lineal, por metro cuadrado y por planta. El objetivo es determinar la carga y el estado de desarrollo del cultivo.
2. **Muestreo de daño:** se revisan los cuadros y bellotas de los 5 metros lineales para cuantificar los daños de gusano rosado, picudo, gusano bellotero y conchuela. Se revisan solo 100 fructificaciones en caso de que la carga de los 5 metros lineales exceda de esta cantidad.



3. **Muestreo de terminales:** se revisan 20 terminales alrededor de cada uno de los 5 puntos de muestreo para obtener una muestra total de 100 terminales. También se pueden tomar al azar en todo el campo las 100 terminales. Se registra el número de terminales con huevecillos y larvas de primero y segundo instar de gusano bellotero y tabacalero.

Niveles de infestación para tomar decisiones de control de plagas del algodonoero

Plaga	Niveles de infestación
Gusano rosado <i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders)	12% de bellotas medianas infestadas con larvas de 1º y 2º instar.
Gusano bellotero y tabacalero <i>Heliothis zea</i> (Boddie) <i>Heliothis virescens</i> (Fabricius)	5-6% de terminales infestadas con larvas de 1º y 2º instar

Dinámica poblacional de maleza

Para determinar la dinámica poblacional se **contabilizará** el número de plantas de las diferentes especies de maleza presentes en el área experimental en cada uno de **4 sitios de muestreo** por cada tratamiento en las 4 repeticiones se contabilizarán las especies de maleza presentes en 0.25 m². Se sugiere que se mantengan los puntos de muestreo durante el ciclo del algodonoero.

Se realizará un muestreo antes de la aplicación del herbicida FAENA y hasta 4 muestreos después de cada aplicación a los 7, 14, 21 y 28 días después de aplicar, o bien hasta que se realice la siguiente aplicación del herbicida FAENA. Aquí se deberá registrar la fecha de los riegos.

Análisis costo-beneficio de la tecnología B2F

En el predio del agricultor designado se registrarán las acciones o prácticas realizadas para el control de maleza e insectos lepidópteros y los costos de control asociados en la o las variedades con el evento B2F. Se tomará en cuenta el diferencial en costo de la semilla convencional vs B2F.



El investigador deberá tomar los mismos datos de prácticas y costos de control de maleza e insectos lepidópteros en el mismo predio o predios cercanos donde haya alguna variedad convencional para establecer un comparativo.

REPORTES

Reporte final

Una vez obtenida la información de rendimiento real y de la calidad de fibra se analizará y discutirá esta información y se elaborará el reporte final en forma de artículo científico. Este reporte deberá ser entregado a Bayer de México S.A. de C.V. a más tardar el **30 de noviembre de 2012**.

Calendario de actividades

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