MONSANTO COMERCIAL S.A. DE C.V.

SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL

ALGODÓN BOLLGARD®II/SOLUCIÓN FAENA FLEX® (EVENTO MON-15985-7 x MON-88913-8)

10/17/2012

REGIÓN DE TAMAULIPAS SUR - CICLO AGRÍCOLA PV - 2013.

CONTENIDO

Art. 5° RLBOGM. 8

I. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DEL PROMOVENTE Y, EN SU CASO, NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL; 8

II. DOMICILIO PARA OÍR Y RECIBIR NOTIFICACIONES, ASÍ COMO EL NOMBRE DE LA PERSONA O PERSONAS AUTORIZADAS PARA RECIBIRLAS; 8

III. DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO PARA RECIBIR NOTIFICACIONES, EN CASO DE QUE EL PROMOVENTE DESEE SER NOTIFICADO POR ESTE MEDIO; 9

IV. MODALIDAD DE LA LIBERACIÓN SOLICITADA Y LAS RAZONES QUE DAN MOTIVO A LA PETICIÓN; 9

V. SEÑALAR EL ÓRGANO DE LA SECRETARÍA COMPETENTE, AL QUE SE DIRIGE LA SOLICITUD; 10

VI. LUGAR Y FECHA, Y 10

VII. FIRMA DEL INTERESADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL, O EN SU CASO, HUELLA DIGITAL. 10

ART. 16 RLBOGM 11

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. 11

I.a. Identificador único del evento de transformación de organismos internacionales de los que México se parte, cuando exista 12

I.b. Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México 12

Uso 13

I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles 16

I.d. Hábitats de persistencia o proliferación 21

I.e. Descripción taxonómica del organismo receptor y donador 23

I.f. País o localidad donde el OGM fue colectado (USA) 24

I.g. Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor 24

I.h. Secuencia génica del evento de transformación (tamaño del fragmento, sitio de inserción y oligonucleótidos) 25

I.i. Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros 32

SECUENCIAS FLANQUEANTES 32

NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS 32

EXPRESIÓN 34

I.j. Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres, expresión de las proteínas y su localización 36

MAPA DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA 36

TIPO DE HERENCIA DE LOS CARACTERES 40

EXPRESIÓN DEL MATERIAL INSERTADO 42

LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTRODUCIDAS 44

I.k. Descripción del método de transformación 44

I.l. Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de efectos no esperados 46

I.m. Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples 48

I.n. Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgene y sus cambios 54

Cry1Ac 54

Cry2Ab 55

EPSPS 56

I.o. Productos de degradación de la proteína codificada por el transgén en subproductos 57

PROTEÍNAS Cry1Ac y Cry2Ab 57

I.p. Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras (promotores, terminadores y otras), descripción, número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora . 61

I.q. Patogenicidad o virulencia de los organismos receptores y donadores 63

Bacillus thuringiensis 63

Agrobacterium tumefaciens cepa CP4 66

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 67

I.s. Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgén 69

I.t. Referencia bibliográfica sobre los datos presentados 71

II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM 80

II.a. Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación 80

II.b. Ubicación del polígono o polígonos donde se realizará la liberación 82

II.c. Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas según características de diseminación 87

III. IDENTIFICACIÓN DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA 95

III.a. Estabilidad de la modificación genética del OGM 95

III.b. Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína en diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren 97

III.c. Características del fenotipo del OGM 99

III.d. Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente receptor del OGM 100

III.e. Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto del organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica 100

III.f. Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM 101

Inocuidad de las proteínas introducidas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS 102

Potencial como maleza 104

Potencial de flujo génico 106

III.g. Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad 107

III.h. Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas 108

Potencial de flujo génico 108

III.i. Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados 110

IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD 111

IV.a. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad 111

IV.b. Medidas y procedimientos de bioseguridad 115

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.....123

V.a. Descripción de la zona en donde se realizó la liberación 123

V.b. Efectos de la liberación sobre la flora y fauna 124

Inocuidad de las proteínas introducidas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS 125

Potencial como maleza 127

Potencial de flujo génico 128

V.c. Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen (descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad) 130

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 131

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 131

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.. 132

VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O BIORREMEDIACIÓN 133

VIII. LA PROPUESTA DE LA VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA 134

A. La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte 134

Ruta de movilización 134

Lugar de origen de la semilla: 135

Destinos intermedios: 135

Agencias aduanales. 135

Destino final: 136

B. El diseño experimental que se llevará a cabo durante la liberación en fase experimental 140

TABLAS

Tabla 1. Especies de *Gossypium* reportadas en la literatura para el Norte de México. 13
Tabla 2. Resumen de los elementos genéticos contenidos en el plásmido PV-GHBK04 utilizado para la obtención del algodón Bollgard®. 26
Tabla 3. Resumen de los elementos genéticos presentes en el plásmido vector PV-GHBK11 utilizado en la obtención del algodón Bollgard®II. 27
Tabla 4. Resumen de los elementos genéticos contenidos en t-DNA del plásmido PV-GHGT35 utilizado en la obtención del algodón Solución Faena Flex®..... 28
Tabla 5. Prácticas agronómicas para el manejo del cultivo del algodón *B2RF* y convencional (Hernández-Jaso *et al*., 1996; Quiñónez-Pando *et al.,* 2000; Machain-Lillingston *et al*., 1988).. 81
Tabla 6. Coordenadas UTM del polígono de Tamaulipas Sur PV-2013 Experimental..... 85

FIGURAS

Figura 1. Distribución puntual de *Gossypium barbadense* L. en México. Los puntos sobre el mapa señalan los registros de colecta de *G. barbadense*. Fuente: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. Algodón *Gossypium barbadense.*..... 21
Figura 2. Representación esquemática del inserto Bollgard® (MON-531) y secuencias genómicas flanqueantes en Bollgard®II (MON-15985). 29
Figura 3. Representación esquemática del inserto MON-15947 y secuencias genómicas flanqueantes en Bollgard®II. 30
Figura 4. Representación esquemática del inserto y secuencias genómicas flanqueantes en Solución Faena Flex®. 31
Figura 5. Mapa de restricción del inserto utilizado para la obtención del evento Bollgard®II (MON-15985-7) a partir de su línea parental (Bollgard®) mediante la inserción del cassette conteniendo el gen *cry2Ab2* por aceleración de partículas..... 33
Figura 6. Mapa de la construcción genética del plásmido PV-GHBK04 utilizado en la transformación genética del algodón Bollgard®. 37
Figura 7. Mapa de la construcción genética del plásmido PV-GHBK11 utilizado para introducir el gen *Cry2Ab* en plantas de algodón portadoras del gen Bollgard® (*cry1Ac*). 38
Figura 8. Mapa del plásmido vector PV-GHGT35. 39
Figura 9. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS presente en el algodón *B2RF*. 49
Figura 10. Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* (*B.t.k.*) que expresa el algodón Bollgard® línea 531 transformada con el vector PV-GHBK04 y el algodón *B2RF*. 52

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la proteína neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII) presente en las plantas de algodón *B2RF*. 53
Figura 12. Secuencia de aminoácidos de la proteína *AAD* presente en el algodón *B2RF*. 53
Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry2Ab expresada por el algodón *B2RF*. El péptido de tránsito al cloroplasto se muestra en itálicas (1-79). La proteína Cry2Ab corresponde a los aminoácidos 80-713. Los aminoácidos subrayados (77-79) corresponden a la porción esperada del péptido de tránsito a cloroplasto remanente después del procesamiento. El aminoácido en la posición 81 (D, ácido aspártico) corresponde a la secuencia introducida para fines de clonación. 53
Figura 14. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GUS. 54
Figura 15. Localización geográfica del Polígono propuesto para la liberación de la tecnología *B2RF* en Tamaulipas Sur en Etapa Experimental durante el ciclo agrícola PV-2013. 83
Figura 16. Municipios comprendidos por el Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013. 83
Figura 17. Distritos de Desarrollo Rural comprendidos por el Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013. 84
Figura 18. Zonas Agrícolas comprendidas por el Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013. 84
Figura 19. El Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013 no contiene Áreas Naturales Protegidas. 85
Figura 20. Principales vías de comunicación de la zona de liberación en el Polígono de la región de Tamaulipas Sur. 94

CUADROS

Cuadro 1. Origen e historia de selección de la variedad Coker 312. 11
Cuadro 2. Cantidad de OGM (B2RF) a liberar en la región de Tamaulipas Sur. 80
Cuadro 3. Despepites autorizados para la región de Tamaulipas Sur. 122

SOLICITUD DE PERMISO PARA LIBERACIÓN AL AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL DEL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO ALGODÓN BOLLGARD®II/SOLUCIÓN FAENA FLEX® (MON-15985-7 x MON-88913-8) EN LAS REGIONES ALGODONERAS DE TAMAULIPAS SUR, DURANTE EL CICLO AGRÍCOLA PRIMAVERA - VERANO 2013.

Art. 5° RLBOGM.

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

Monsanto Comercial, S.A. de C.V.
Representante legal
Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico.
Ing. José Javier Gándara Espinosa.
M. en C. Luis Adrián Castillo León.
Biol. Giovani Medina Palacios.
Ing. César Adrián Espinosa Mancinas.

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

Prolongación Paseo de la Reforma 1015 Torre A Piso 21
Desarrollo Santa Fe
01376 México, D.F.

Personas autorizadas para recibir las notificaciones:
a) Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico.
b) Ing. José Javier Gándara Espinosa.
c) M. en C. Luis Adrián Castillo León.
d) Biol. Giovani Medina Palacios.
e) Ing. César Adrián Espinosa Mancinas.

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

NOMBRE	CARGO	Correo electrónico
Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico.	Director de Asuntos Regulatorios de Latinoamérica Norte	eduardo.perez.pico@monsanto.com
Ing. José Javier Gándara Espinosa.	Gerente de Asuntos Regulatorios	jose.javier.gandara@monsanto.com
M. en C. Luis Adrián Castillo León	Coordinador de Asuntos Regulatorios	luis.adrian.castillo@monsanto.com
Biol. Giovani Medina Palacios	Coordinador de Asuntos Regulatorios	giovani.medina@monsanto.com
Ing. César Adrián Espinosa Mancinas.	Coordinador de Asuntos Regulatorios	cesar.adrian.espinosa@monsanto.com

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

Que por medio de la presente me dirijo a Usted para presentar, con base a los artículos 32 fracción I, 36, 42, 44, 46, 70 y 71 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), los artículos 3, 5, 6, 7, 16 y 22 del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (RLBOGM).

La Ley de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados contempla para los cultivos biotecnológicos las etapas de liberación experimental, piloto y comercial. Tomando como base el largo historial de cultivo, de más de 10 años, del algodón Bollgard®, Bollgard®/Solución Faena® y Solución Faena® y en la experiencia acumulada con las nuevas tecnologías Bollgard®II, Solución Faena Flex® y **Bollgard®II/Solución Faena Flex®** introducidas desde 2004 en las regiones algodoneras del norte del país; solicitamos atentamente el obtener la aprobación en **ETAPA EXPERIMENTAL** para el algodón **BOLLGARD®II/SOLUCIÓN FAENA FLEX®** (***B2RF***)**.** Esto con el objetivo de comercializarlo en la **región de TAMAULIPAS SUR** y cumplir con las expectativas de los agricultores de adquirir un producto biotecnológico que provea de protección en caso de presentarse aumentos en la incidencia de insectos lepidópteros y permita un mejor control de malezas mediante la aplicación de glifosato.

Con la finalidad de soportar nuestra solicitud para el avance regulatorio de los programas de algodón ***B2RF*** se han llevado a cabo estudios de evaluación experimental agronómica, fenológica y fenotípica de la tecnología algodón ***B2RF***, organismos no blanco, toxicidad, manejo de resistencia, beneficios ambientales y económicos en las regiones algodoneras del norte de México.

Estas evaluaciones incluyen las áreas agrícolas del norte del Estado de Tamaulipas, aledañas a las solicitadas en este documento, donde se operará la **Etapa Comercial** (PV-2013 y posteriores), a partir de febrero de 2013. Estos estudios sustentan la seguridad ambiental y los beneficios económicos que dicho evento biotecnológico representa para la producción de algodón en México.

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

Conforme al Capítulo III, artículo 10, fracciones I y II, artículo 11 y artículo 12 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y del Capítulo I artículo 2, fracción VII. Se dirige esta solicitud a la secretaría(as) competente(s): **SAGARPA** y **SEMARNAT** en el ámbito de sus competencias.

VI. LUGAR Y FECHA, Y

México, Distrito Federal a 17 de octubre de 2012.

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

Se anexa copia de los poderes para los representantes legales. **ANEXO 1. REPRESENTANTES LEGALES MOCSA.**

ART. 16 RLBOGM

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

El algodón **Bollgard®II/Solución Faena Flex®** (***B2RF***), evento MON-15985-7 x MON-88913-8, resistente a lepidópteros y tolerante a glifosato, se obtuvo mediante cruza convencional a partir de los eventos Bollgard®II **(*B2*)** (MON-15985-7) y Solución Faena Flex® **(*RF*)** (MON-88913-8). El algodón ***B2*** fue obtenido al insertar el gen *cry2Ab* en el genoma del algodón Bollgard® **(*BG*)** (MON-00531-6) variedad DP 50 B (que contiene los genes *cry1Ac* y *npt II*) mediante bombardeo de partículas o biobalística.

El organismo receptor tanto para la tecnología ***BG***, a partir del cual se obtuvo el evento ***B2***, como para la tecnología ***RF*** fue la variedad de algodón (*Gossypium hirsutum*) denominada Coker 312. Esta variedad se desarrolló mediante técnicas de mejoramiento convencional por la compañía Coker's Pedigreed Seed Company a partir de las variedades Coker 100 Staple x Deltapine 15, durante el periodo 1948 hasta 1971, que es cuando fue lanzada comercialmente en Estados Unidos **(Cuadro 1).**

Cuadro 1. Origen e historia de selección de la variedad Coker 312.

ETAPA	AÑO	ACTIVIDAD
1	1948	Cruza: Cocker 100 Staple x Deltapine 15
2	1950-1959	Programa de selección de líneas a través de generaciones sucesivas para producir la línea Coker 60-111.
3	1960-1966	Selección de líneas en Coker 60-111 que produjo la línea Coker 66-115, más tarde denominada Coker 310.
4	1966-1968	Selección de líneas en Coker 66-115 para producir la línea Coker 68-312, denominada Coker 312.
5	1968-1971	El algodón Coker 68-312 se evaluó en pruebas de campo con replicas y con pruebas contra enfermedades a través del denominado cinturón algodonero de Estados Unidos. La semilla se incrementó para producir un pequeño volumen de semilla de origen durante la estación de siembra en Carolina del Sur en el periodo de 1970. La continua re selección dentro del Coker 68-312 ha dado lugar al mantenimiento de las cepas las que serán utilizadas para producir semillas de origen en los años venideros.
6	1971	Se produjo el certificado de la semilla Coker 312, bajo contrato con Canyon Gin, Lubbock, Texas, para su distribución a los agricultores para siembra en 1972 dentro de esta área.

La variedad de algodón Coker 312 fue utilizada debido a su respuesta favorable al sistema de cultivo de tejidos utilizado en el proceso de obtención de las plantas genéticamente modificadas. Varios investigadores han demostrado que el cultivar Coker 312 y otros cultivares relacionados con esta línea poseen características genéticas de buena respuesta al cultivo de

tejidos (Trolinder y Goodin, 1987; Umbeck *et al.,* 1987). Las características *B2* y *RF* han sido desde entonces transferidas a diversas variedades comerciales de algodón, utilizando técnicas de mejoramiento tradicionales.

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

De acuerdo a la OCDE, el algodón **Bollgard®II/Solución Faena Flex®**, resistente a lepidópteros y tolerante a glifosato tiene un identificador único: **MON-15985-7 x MON-88913-8**

Nombre común: Algodón
Nombre comercial: Algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®
Nombre del evento: MON-15985-7 x MON-88913-8
Identificador único OECD: El identificador único del algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® es **MON-15985-7 x MON-88913-8** y se encuentra disponible en el sitio de internet del Biosafety Clearing House (http://bch.biodiv.org/), en el sitio de internet del Biotrack Database de la OECD (http://www.oecd.org/) y en la base de datos del Center for Environmental Risk Assessment (CERA) (http://cera-gmc.org/).

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

De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (http://www.ars-grin.gov), se reportan las siguientes especies de *Gossypium* para la región Norte de México **(Tabla 1).**

En adición a la literatura consultada, se realizó una búsqueda sobre la presencia de especies del género *Gossypium* en el **Estado de Tamaulipas**, en el sistema de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB)[1]. Los resultados de la búsqueda indican dos reportes para la especie *Gossypium hirsutum* y no se encontraron registros de especies silvestres emparentadas en estas bases de datos (http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_distribucion.cgi).

[1] La Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) es un sistema computarizado de información biológica (incluye bases de datos de tipo curatorial, taxonómico, ecológico, cartográfico, bibliográfico, etnobiológico, de uso y catálogos sobre recursos naturales y otros temas), basado en una organización académica interinstitucional descentralizada e internacional formada por centros de investigación y de enseñanza superior, públicos y privados, que posean tanto colecciones biológicas científicas como bancos de información. La REMIB, es una red interinstitucional que comparte información biológica. Está constituida por nodos, formados por los centros de investigación que albergan las colecciones científicas.

Tabla 1. Especies de *Gossypium* reportadas en la literatura para el Norte de México.

Especie	Localidad	Número de cromosomas	Año de descubrimiento	Uso
Gossypium hirsutum L.	Regiones agrícolas	52	1763	Cultivada
Gossypium thurberi Tod	Sonora, Baja California Sur, Chihuahua	26	1854	Silvestre
Gossypium davidsonii Kellogg	Baja California Sur, Sonora	26	1873	Silvestre
Gossypium armourianum Kearney	Baja California Sur	26	1933	Silvestre
Gossypium harknessii Brandegee	Baja California Sur	26	1933	Silvestre
Gossypium aridum (Rose & Standl.) Skovst	Sinaloa	26	1911	Silvestre
Gossypium trilobum (Mocino & Sesse ex DeCandolle) Skovsted	Sinaloa	26	-	Silvestre
Gossypium turneri Fryxell	Sonora	26	-	Silvestre

Colectas en el Estado de Tamaulipas.

Gossypium hirsutum. Colección: Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX); TEX 00074435; Fecha de colecta: 18-Septiembre-1981; colector(es): P. A. Fryxell & R. Magill; Localidad: Soto La Marina, Punta Esterillas, orilla Oeste de Laguna Morales, al Sur de La Pesca, cerca del nivel del mar; Sitio: Longitud: -97º 46' 30'', Latitud: 23º 41' 0''; Hábitat: parches entremezclados de salinas, pasto alto (*Spartina spartinae*) y montículos de matorrales espinosos con algo de manglar y pasto, cerca de la orilla del mar. Tipo de preparación: Herborizado (http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_distribucion.cgi).

Gossypium hirsutum. Colección: Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX); TEX 00074437; Fecha de colecta: 20-Febrero-1939; Colectores: H. LeSueur; Localidad: Soto La Marina, San José de los Leones; Sitio: Longitud: -97º 47' 26.02''; Latitud: 24º 16' 43''; Tipo de preparación: Herborizado (http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_distribucion.cgi).

La especie *Gossypium hirsutum* es la principal especie de algodón cultivado y representa aproximadamente el 90% de la producción mundial de fibra y aceite de algodón. Por lo tanto, estas dos observaciones se deben muy probablemente a dos plantas voluntarias de cultivos de algodón comerciales y no a parientes silvestres. Además, estas especies se localizaron en áreas no agrícolas hace más de 20 años, por lo tanto, no existe peligro de entrecruzamiento con estos especímenes.

Bases de datos consultadas:

- Herbario XAL del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-XAL)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-xal.html
- Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/encb-ipn.html
- Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/bangev-uach.html
- Herbario de la Universidad de Texas - Austin, EUA (LL, TEX)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ll-tex.html
- Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-Bajío)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-bajio.html
- Colección de Monocotiledóneas Mexicanas (UAM-I)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/uam-i.html
- Herbario del Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBIO)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/inbio.html
- Árboles y Arbustos Nativos para la Restauración Ecológica y Reforestación de México (IE-DF,UNAM)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-df-unam.html
- Herbario Sessé y Mociño: Plantas de la Real Expedición Botánica a Nueva España (1787 - 1803) (MA)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/sesse.html
- w3TROPICOS, Jardín Botánico de Missouri (MO)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/missouri.html
- Herbario del CIBNOR
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_cibnor.html
- Herbario Weberbauer de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/lamolina.html
- Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México (FES-I, UNAM)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_valle_tehuacan_cuicatlan.html
- Herbario de la Universidad de Arizona, EUA (ARIZ)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_universidad_arizona.html

- Herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, México (CICY)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/cicy_yucatan.html

- Agentes Bioactivos de Plantas Desérticas de Latinoamérica (ICBG)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ibunam_ibcg.html

- Herbario Kew del Real Jardín Botánico (RBGKEW)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/kew.html

- Ejemplares tipo de plantas vasculares del Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ejemplares_tipo_plantas_vasculares.html

- Estudio Florístico de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_floristico_ipn.html
- Estudio monográfico del género Echinopepon Naud. (Cucurbitaceae) en México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_monografico_ipn.html

- La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de Las Salinas, Puebla, México (FES-I, UNAM)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_utildos_comunidades.html

- Herbario de Geo. B. Hinton, México
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/hinton.html

- Colección de ejemplares tipo del Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/coleccion_ejemplares_herbario%20_tx.html

- Programa de repatriación de datos de ejemplares mexicanos
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/jbny.html

- Colecciones de George Boole Hinton depositadas en el herbario de Kew: Familia *Leguminosae*
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/rbgk.html

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 (Milton y Allen, 1995).

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 anfidiploide[2] (**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. El sureste de México y Guatemala son considerados como el **centro de origen y diversidad** de la especie *Gossypium hirsutum* L. Adicionalmente, 11 de las 13 especies silvestres diploides conocidas son endémicas de México. Éstas se encuentran distribuidas en la zona costera del Océano Pacífico y en los Estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Veracruz (Palomo, 1996).

I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles

Las especies de *Gossypium* originarias de México reportadas en la literatura son las siguientes (Fryxell, 1984; Palomo, 1996):

G. aridum (Rose y Standley) Skovsted, está distribuida en las costas de Veracruz, Puebla, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Colima y Sinaloa. Posee hojas enteras, lo cual la coloca entre las especies más antiguas. La flor es de color rosáceo con centro de color rojo-oscuro. La cápsula

[2] Anfidiploide (alopoliploide): poliploide formado tras la unión de dos conjuntos de cromosomas distintos y su posterior duplicación.

(bellota o fruto) es alargada con cuatro celdas (lóculos) que contienen numerosas semillas de 4 a 6 mm de largo. La fibra que cubre la semilla es muy corta y de color café. Es la única especie diploide de México que se localiza en las costas del Océano Atlántico y cuenta con genes que confieren resistencia a las enfermedades conocidas como viruela del algodón (*Puccinia cacabata* A&H), y secadera tardía (*Verticillium dahliae* K.). Esta especie es caducifolia y florea cuando no presenta hojas, se desarrolla en pendientes y suelos delgados y pedregosos.

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

G. davidsonii Kellogg, se localiza en las costas del sur de Sonora y Baja California Sur y en las Islas de Revillagigedo. Esta especie es de interés desde el punto de vista evolutivo del género *Gossypium*, ya que tiene hojas enteras ovadas y es difícil de cruzar con otras especies. La evolución del género es en el sentido de pasar de formas con hojas enteras hacia formas con hojas partidas (lobuladas), por tal razón, es posible que *G. davidsonii* sea la especie más ancestral que surgió en las primeras fases de la evolución de este género (Lemeshev, 1978). La flor es de color amarillo con una pequeña mancha de color rojo en el interior, su cápsula es ovoide y generalmente, tiene cuatro lóculos. La semilla mide 6 mm de largo y tiene fibra corta y escasa. Esta especie se caracteriza por contar con una alta pubescencia en sus órganos vegetativos, lo que le da resistencia al ataque de plagas (insectos chupadores).

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

G. harknessii Brandegee, se localiza en Baja California Sur y en la isla del Carmen. Especie caducifolia; sus hojas son enteras algo lobuladas y más anchas que largas. La flor es de color amarillo con base interior de color rojo y la cápsula es ovoide con tres a cuatro lóculos. Las semillas miden de 8 a 10 mm de largo con fibras grisáceas muy pequeñas y fuertemente adheridas. Al igual que *G. armourianum*, es muy resistente a la sequía y tiene brácteas caducas. Es una especie muy importante ya que aportó los genes de esterilidad genético-citoplásmica y los genes restauradores de la fertilidad que hicieron posible la formación de genotipos híbridos de algodón con propósitos comerciales (Meyer, 1973). Habita en pendientes fuertes y suelos muy delgados y pedregosos.

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

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

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

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

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

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

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

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

Para que se presente el flujo de genes de materiales cultivados a parientes silvestres vía cruzamiento se deben cumplir con ciertas condiciones: **1)** el cultivo y su pariente silvestre deben presentarse en proximidad espacial; **2)** sus períodos de fecundidad deben coincidir; **3)** se debe encontrar un vector idóneo para transportar el polen entre los dos materiales; **4)** los materiales parentales deben ser sexualmente compatibles; **5)** el híbrido resultante del cruzamiento debe dar origen a una semilla viable; **6)** los híbridos deben ser fértiles y ecológicamente adaptados al ambiente.

Todas las especies de *Gossypium* presentan autopolinización aunque pueden presentarse ciertos cruzamientos intra-específicos y posiblemente inter-específicas mediados por insectos. ***El transporte del polen por el viento nunca se ha reportado en el género Gossypium***, lo cual se explica por la textura y consistencia del polen producido en antesis. ***El polen de algodón es pesado*** y el transporte por el viento es prácticamente nulo (Niles y Feaster, 1984). Además, ***el polen de G. hirsutum es viable por no más de 24 horas, las flores como las de todos los miembros de Malvaceae, son receptivas únicamente el día en que abren. Por lo tanto, la probabilidad de flujo genético se ve reducida considerablemente.***

Los estudios de Hutchinson (1959) citados por Palomo (1996) sobre la variabilidad existente en la especie *G. hirsutum* identifican seis razas geográficas: *latifolium*, *morrili*, *palmeri*, *richmondi*, *yucatanense* y *punctatum*, todas ellas de día corto. Las características y distribución de estas razas son las siguientes:

G. hirsutum latifolium, es originaria del Estado de Chiapas y presenta la mayor variabilidad. Las bellotas son de tamaño mediano a grande y de forma oval o redonda. La fibra es de color blanco o café, con una longitud que oscila entre los 21.3 y los 28.7 mm. De esta raza se derivaron las variedades conocidas como “Acala”.

G. hirsutum morrilli, se le encuentra en Oaxaca, Puebla y Morelos. Posee bellotas de tamaño mediano a muy pequeño. Es de fibra corta, la longitud máxima es de 25 mm, de color que varía del café al blanco.

G. hirsutum palmeri, se le localiza en Oaxaca, Guerrero y Michoacán. Tiene hojas con lóbulos muy hendidos, largos y delgados, se le conoce comúnmente como mano de chango. Su bellota es pequeña y de forma oval o redonda. La fibra es de color blanco y su longitud varía de los 7 a los 25.9 mm.

G. hirsutum richmondi, es originaria de Oaxaca y, generalmente, de bellota pequeña. Su fibra es corta, fina y de color blanco. La longitud de la fibra oscila entre los 10 y los 26.7 mm.

G. hirsutum yucatanense, es originaria de la Costa norte de Yucatán, es una planta rastrera con flor de color amarillo y fibra de color café.
G. hirsutum punctatum, se le encuentra en los Estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo. Tiene bellotas de redondas a ovales y de diferente tamaño. Poseen fibra larga, de color café o blanco. La longitud de la fibra varía de los 24 mm a los 29.2 mm.

En un estudio más reciente ***(Ulloa et al., 2006) encontró que, con una excepción, las razas de G hirsutum mencionadas anteriormente, no se cultivan en México en la actualidad y que su abundancia y, por lo tanto, su conservación in situ está muy limitada a plantas que crecen ocasionalmente en áreas perturbadas y como plantas de jardín mantenidas sólo por curiosidad por algunos habitantes de áreas rurales.*** Durante las expediciones realizadas en los Estados de México, Morelos, Puebla, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco y Nayarit, se localizaron siete especies de algodón silvestre: *G. aridum*, *G. barbadense*, *G. gossypioides*, *G. hirsutum*, *G. laxum*, *G. lobatum* y *G. schwendimanii*. La conservación *in situ* de algunas de estas especies también se encuentra seriamente amenazada por las actividades humanas.

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a las especies del género *Gossypium*. Todas las especies de *Gossypium* presentan autopolinización aunque pueden presentarse ciertos cruzamientos intraespecíficos y posiblemente interespecíficos mediados por insectos. Nunca se ha reportado el transporte del polen por el viento en el género *Gossypium*, lo cual se explica por la textura y consistencia del polen producido durante la antesis. El polen de *G. hirsutum* es viable por no más de 24 horas. Las flor, como las todos los miembros de la familia Malvaceae, son receptivas únicamente el día en que abren.

Las especies silvestres reportadas para México son diploides (2n=2x=26) y, por lo tanto, son sexualmente incompatibles con el algodón cultivado G. hirsutum el cual es una especie alotetraploide (2n=4x=52). En el caso de que se pudieran encontrar especies silvestres cercanas a las regiones agrícolas y en el improbable caso de que pudieran quedar en contacto con polen de *G. hirsutum* (tetraploide), el producto de la fecundación sería triploide.

Por lo tanto, durante la metafase de la meiosis no se podría realizar el apareamiento de cromosomas homólogos, imposibilitando así la formación de un cigoto fértil por la disparidad de los sistemas genéticos. ***A esta barrera genética se debe incluir la barrera temporal para el entrecruzamiento ya que no se presenta coincidencia en los períodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales.*** Por otra parte, la distribución de la especie alotetraploide *G. barbadense* se encuentra limitada principalmente al sureste de México, lejos de las zonas productoras de algodón comercial en el norte del país (**Figura 1**).

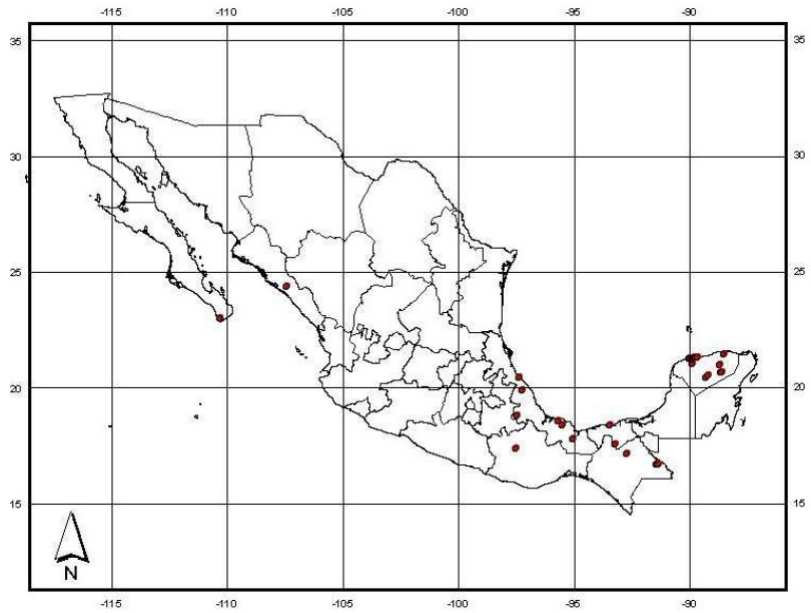


Figura 1. Distribución puntual de *Gossypium barbadense* L. en México. Los puntos sobre el mapa señalan los registros de colecta de *G. barbadense*. **Fuente**: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. Algodón *Gossypium barbadense*.

I.d. Hábitats de persistencia o proliferación

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

Distribución:

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

ciclo vegetativo dura alrededor de 135 a 180 días, dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales. El algodón es una planta de tipo fotosintético C_3[3].

***Fotoperiodo**:*

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

***Altitud**:*

0-600 m.

***Requerimientos hídricos**:*

El algodón requiere entre 700 y 1300 mm de agua por ciclo de cultivo y se desarrolla en zonas con precipitación anual de 500-1800 mm. En condiciones de una evapotranspiración de 5 a 6 mm/día, la absorción de agua comienza a reducirse (afectando el rendimiento) cuando el agotamiento del agua del suelo excede del 65%.

***Humedad ambiental**:*

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

***Temperatura**:*

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

***Luz**:*

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

[3] En las plantas C_3 el CO_2 entra en el ciclo de Calvin y se fija a la RuDP produciendo dos moléculas de PGA (3 C). Los estomas se abren durante el día.

Requerimientos de suelo.

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

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

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

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

I.e. Descripción taxonómica del organismo receptor y donador

El algodón es un miembro de la familia Malvaceae, en algunas ocasiones referida como la familia de la malva. A continuación se presenta la clasificación taxonómica del algodón de acuerdo con ITIS (Integrated Taxonomic Information System *http://www.itis.usda.gov/index.html*) y NRCS (Natural Resources Conservation Service-United States Deparment of Agriculture, *http://plants.usda.gov*).

Reino: Plantae - Vegetal
Subreino: Tracheobionta – Plantas vasculares
Superdivisión: Spermatophyta – Plantas con semillas
División: Magnoliophyta – Plantas con flores
Clase: Magnoliopsida – Dicotiledóneas
Subclase: Dilleniidae
Orden: Malvales
Familia: Malvaceae
Género: *Gossypium* L. – algodón cultivado
Especie: *Gossypium hirsutum* L. – algodón cultivado
Variedad: *Gossypium hirsutum* L. var. *hirsutum* – algodón cultivado
Variedad comercial: Coker 312.

Se considera que los algodones tetraploides, incluyendo *G. barbadense* y *G. hirsutum*, evolucionaron separadamente en las Américas; no obstante, no existen barreras genéticas para la hibridación intraespecífica de las especies tetraploides de *Gossypium*, es decir, pueden cruzarse con plantas tetraploides de su misma especie (*hirsutum* y *barbadense*) (Percival *et al*., 1999).

Los programas de mejoramiento del algodón toman ventaja de las características existentes en las especies y mediante retrocruzamiento con el germoplasma parental mantienen las características ya sea de *G. hirsutum* o *G. barbadense* o bien de la variedad de interés. Por ejemplo, las variedades de algodón Acala de California y Nuevo México, integran especies tanto de *G. hirsutum* como de *G. barbadense* en su pedigrí (Smith *et al*., 1999), pero comúnmente son identificadas simplemente como *G. hirsutum*.

De acuerdo a algunas clasificaciones para la delineación de las especies, *G. barbadense* y *G. hirsutum* podrían ser clasificadas como sub-especies o variantes de una misma especie y no como especies separadas (Rieger *et al*., 1976).

La identidad de los progenitores de *G. hirsutum* y de *G. barbadense* permanece de alguna manera incierta (Brubaker *et al*., 1999), pero mantienen su clasificación como especies separadas.

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

Tecnología Bollgard®II/Solución Faena Flex®
Monsanto Company
700 Chesterfield Village Parkway North
St. Louis Missouri, USA.

Semilla
Delta & Pine Land Cotton Seed Co.
Scott, Mississippi, 38772, USA.

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 (Milton y Allen, 1995).

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 anfidiploide[4] (**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. El sureste de México y Guatemala es considerado como el centro de origen y diversidad de la especie *Gossypium hirsutum* L., la cual es la especie cultivada más importante en la actualidad. Adicionalmente, 11 de las 13 especies silvestres diploides conocidas son endémicas de México. Éstas se encuentran distribuidas en la zona costera del Océano Pacífico y en los Estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Veracruz (Palomo, 1996).

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

El algodón ***B2RF*** **(MON-15985-7 x MON-88913-8)** fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8). Por lo tanto, los fragmentos de DNA insertados en cada línea parental están presentes en ***B2RF*** **(Carpeta Secuencias nucleotídicas)**.

Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas se muestran en las **Tablas 2, 3 y 4**. Las representaciones esquemáticas de los insertos de ***B2*** y ***RF*** se presentan en las Figuras **2, 3** y **4**.

[4] Anfidiploide (alopoliploide): poliploide formado tras la unión de dos conjuntos de cromosomas distintos y su posterior duplicación.

Tabla 2. Resumen de los elementos genéticos contenidos en el plásmido PV-GHBK04 utilizado para la obtención del algodón Bollgard®.

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

Tabla 3. Resumen de los elementos genéticos presentes en el plásmido vector PV-GHBK11 utilizado en la obtención del algodón Bollgard®II.

Elemento genético	Rango (pb)	Descripción
P-e35S	183 - 797	Promotor 35S del CaMV (virus del mosaico de la coliflor) (Odell *et.al.,* 1985) con la región potenciadora duplicada usado para dirigir la expresión del gen *uidA*.
Secuencias intermedias	798 - 828	Secuencia sintética (sitio de clonación múltiple).
uidA	829 - 2637	Gen del plásmido de pUC19 de *Escherichia coli* que codifica la proteína β-D-glucuronidasa (GUS) usado como marcador visual para identificar plantas transformadas (Gilissen *et. al.,* 1998).
Secuencias intermedias	2638 - 2692	Secuencia sintética (sitio de unión)
NOS 3'	2693 - 2948	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*, el cual termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley *et. al.*, 1983).
Secuencias intermedias	2949 - 3013	Secuencia sintética (sitio de unión).
P-e35S	3014 - 3627	Promotor 35S del CaMV (virus del mosaico de la coliflor) (Odell *et al.,* 1985) con la región potenciadora duplicada usado para dirigir la expresión del gen *cry2Ab*.
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 *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Van den Broeck, *et al.,* 1985)
cry2Ab	3966 - 5873	Gen sintético *cry2Ab* basado en la secuencia del gen de *Bacillus thuringiensis* (Widner y Whiteley, 1990)
Secuencias intermedias	5874 - 5896	Secuencia sintética (sitio de clonación múltiple)
NOS 3'	5897 - 6152	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* el cual termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley *et. al.*, 1983).
Secuencias intermedias	6153 - 6277	Secuencia sintética (sitio de unión)
Esqueleto del plásmido	6278 - 158	(Vieira y 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 *Escherichia coli* (Beck *et al.,* 1982). El gen *nptII* también contiene una porción de 0.153 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)

Tabla 4. Resumen de los elementos genéticos contenidos en t-DNA del plásmido PV-GHGT35 utilizado en la obtención del algodón Solución Faena Flex®.

Elemento genético	Función
P[1]- FMV/TSF1	Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen TSF1 de *Arabidopsis thaliana* y secuencias potenciadoras del promotor 35 S del virus del mosaico de la *Scrophularia* (FMV)
L[2]-TSF1	Secuencia líder (exón 1) del gen TSF1 de *Arabidopsis thaliana* que codifica al factor de elongación EF-1alfa.
I[3]-TSF1	Intrón del gen TSF1 de *Arabidopsis thaliana* que codifica al factor de elongación EF-1alfa.
TS[4]- *ctp*2	DNA derivado de *Arabidopsis thaliana*. Péptido de tránsito al cloroplasto aislado de la EPSPS de *Arabidopsis thaliana*, empleado para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, el sitio de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.
CR- *cp4 epsps*	Secuencia de DNA codificando para la proteína CP4 EPSPS de *Agrobacterium sp* cepa CP4.
T[5]-E9	Secuencia de DNA derivada de *Pisum sativum,* conteniendo la región 3' no traducida del gen *rbc* E9, codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa de chícharo.
P-35S/ACT8	Promotor quimérico constituido por la región promotora del gen ACT8 de *Arabidopsis thaliana* combinado con secuencias potenciadoras del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor
L-ACT8	Secuencia líder del gen ACT8 de *Arabidopsis thaliana.*
I-ACT8	Intrón y secuencia del exón flanqueante del gen ACT8 de *Arabidopsis thaliana.*
TS-*ctp*2	Secuencia de DNA derivado de *Arabidopsis thaliana*. Péptido de tránsito al cloroplasto aislado de la EPSPS de *Arabidopsis thaliana*, empleado para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, el sitio de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.
CR - *cp4 epsps*	Secuencia de DNA codificando para la proteína CP4 EPSPS de *Agrobacterium sp.* cepa CP4.
T-E9	Secuencia de DNA derivada de *Pisum sativum,* conteniendo la región 3' no traducida del gen *rbc* E9, codificante para la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa de chícharo.

[1] P - Promotor
[2] L - Líder
[3] I - Intrón
[4] TS - Secuencia del péptido de tránsito.
[5] T - secuencia no traducida de terminación de la transcripción y secuencias señal de poliadenilación.

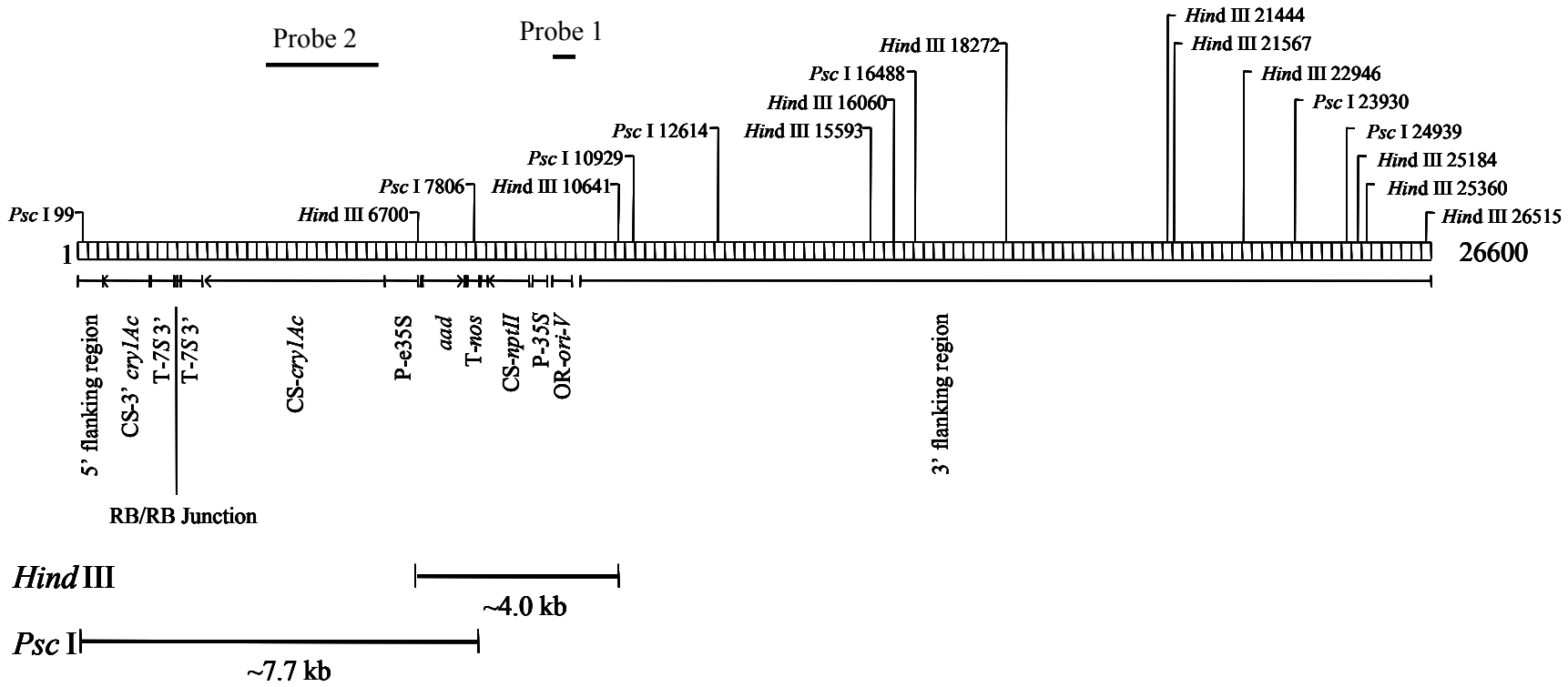


Figura 2. Representación esquemática del inserto Bollgard® (MON-531) y secuencias genómicas flanqueantes en Bollgard®II (MON-15985).

Mapa lineal mostrando el primer inserto en Bollgard®II, encontrado también en Bollgard® (MON-531) y DNA adyacente flanqueando el inserto. Los elementos genéticos (incluyendo el gen funcional *cry1Ac*) dentro del inserto se identifican en el mapa, así como también los sitios de restricción con posiciones relativas al tamaño del mapa lineal para enzimas utilizadas en los análisis de hibridación Southern. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Probe 1 (Sonda 1): posición de inicio: 9366; posición de término: 9731 (longitud total ~ 0.4 kb)
Probe 2 (Sonda 2): posición de inicio: 2510; posición de término: 4509 (longitud total ~ 2 kb)

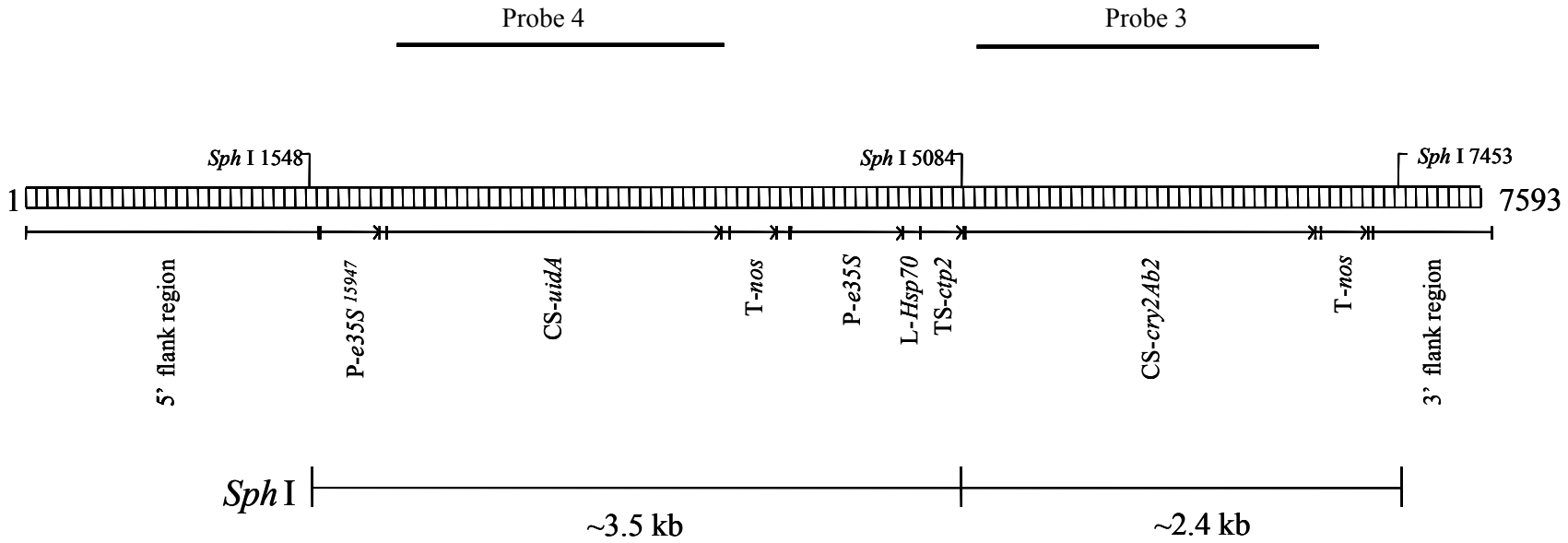


Figura 3. Representación esquemática del inserto MON-15947 y secuencias genómicas flanqueantes en Bollgard®II.

Mapa lineal mostrando el segundo inserto en Bollgard®II (MON-15985), el fragmento denominado MON-15947, y DNA adyacente flanqueando el inserto. Elementos genéticos (incluyendo el gen *cry2Ab2*) dentro del inserto se identifican en el mapa, así como sitios de restricción con posiciones relativas al tamaño del mapa lineal para enzimas utilizadas en los análisis de hibridación Southern. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Probe 3 (Sonda 3): posición de inicio: 5091; posición de término: 6998 (longitud total ~ 1.9 kb)
Probe 4 (Sonda 4): posición de inicio: 1960; posición de término: 3771 (longitud total ~ 1.8 kb)

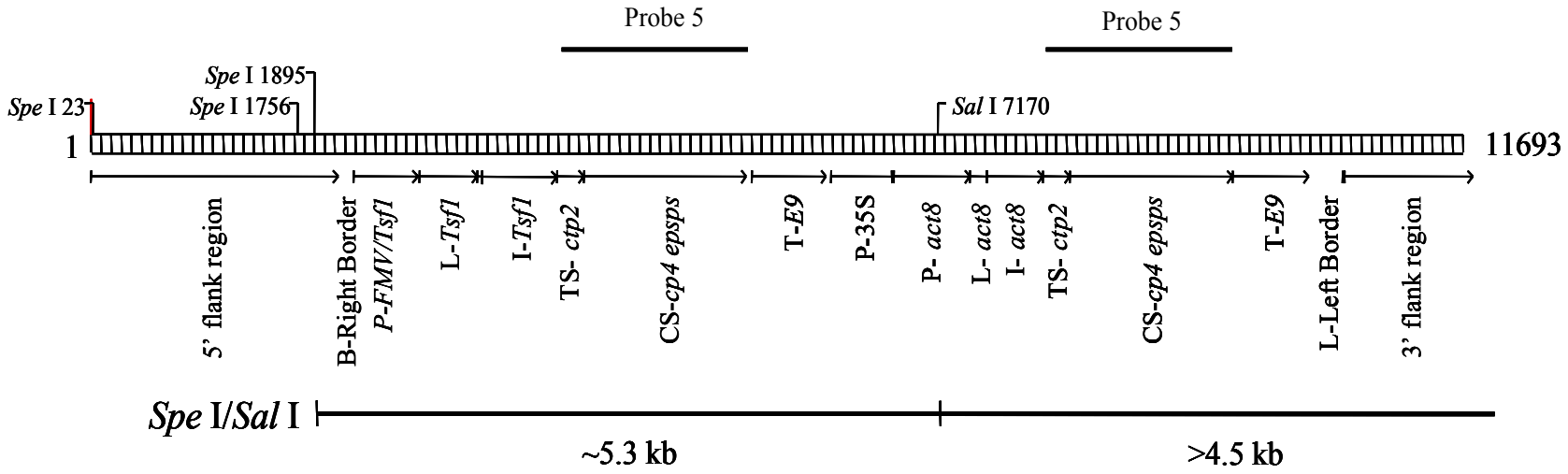


Figura 4. Representación esquemática del inserto y secuencias genómicas flanqueantes en Solución Faena Flex®.

Mapa lineal mostrando el inserto en Solución Faena Flex® (MON-88913) y DNA adyacente flanqueando el inserto. Elementos genéticos dentro del inserto se identifican en el mapa, así como sitios de restricción con posiciones relativas al tamaño del mapa lineal para enzimas utilizadas en los análisis de hibridación Southern. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Probe 5 (Sonda 5): posición de inicio: 6717; posición de término: 8084 (longitud total ~ 1.4 kb)
Probe 5 (Sonda 5): posición de inicio: 10833; posición de término: 12200 (longitud total ~ 1.4 kb)

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

SECUENCIAS FLANQUEANTES

Los fragmentos de DNA insertados en el evento **B2RF** corresponden a los que contienen sus líneas parentales, los eventos sencillos ***B2*** y ***RF***. Por lo tanto, las características de las inserciones y secuencias flanqueantes 5' y 3' están conservados en este evento apilado. Se muestran representaciones esquemáticas de los insertos presentes en los eventos ***B2*** y ***RF*** en las **Figuras 2**, **3** y **4** de la **sección I.h.**

NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS

La caracterización del algodón **Bollgard® (MON-531-6)**, demostró que hay dos insertos de T- DNA. El inserto funcional primario contiene una única copia del gen completo de *cry1Ac*, el gen *nptII* y el gen de resistencia a antibióticos *aad*. Este inserto de T-DNA 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 DNA se encuentra en el extremo 5' del inserto, en forma contigua y en orientación inversa al cassette del gen completo *cry1Ac* y no contiene un promotor. Se detectó un transcrito por transcripción inversa RT-PCR, que corresponde a este segmento 3' del gen *cry1Ac* y al DNA genómico adyacente. En la improbable eventualidad de que este RNA fuera traducido, el péptido resultante sería altamente homólogo a la porción correspondiente al dominio C-terminal de la proteína Cry1Ac. La seguridad de esta proteína teórica se demuestra con los estudios descritos en las secciones siguientes, ya que la proteína, de ser producida, habría sido un componente en todos los estudios de seguridad llevados a cabo tanto con la proteína Cry1Ac, como con plantas o semillas de algodón Bollgard® (Serdy *et al.*, 1994).

El segundo inserto de T-DNA 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 correspondiera o hubiera sido transcrito del inserto de T-DNA de 242 pares de bases 7S 3', por lo tanto no se produce ningún péptido, según lo esperado **(ANEXO 2. MSL 16882 Caracterización Molecular Extendida Bollgard® MON-531)**.

El algodón **Bollgard®II (MON-15985-7)**, resistente al ataque de insectos plaga del orden *Lepidoptera*, fue desarrollado por el método de biobalística empleando el fragmento KpnI del plásmido PV-GHBK11 que contiene los cassettes de expresión de *cry2Ab* y *uidA*. El evento MON-15985-7 no contiene secuencias detectables del esqueleto del plásmido como producto de la transformación **(Figura 5)**. El mapa de restricción del inserto se ilustra a continuación.

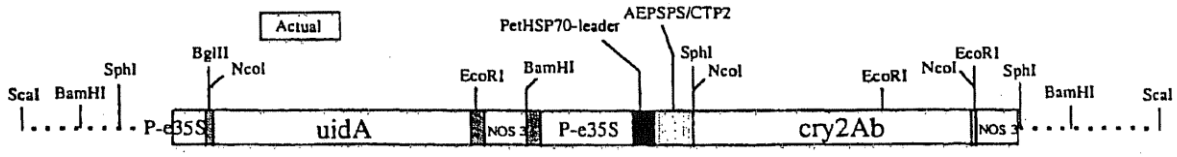


Figura 5. Mapa de restricción del inserto utilizado para la obtención del evento Bollgard®II (MON-15985-7) a partir de su línea parental (Bollgard®) mediante la inserción del cassette conteniendo el gen *cry2Ab2* por aceleración de partículas.

La caracterización molecular del evento ***B2*** (MON-15985-7) fue descrita por Doherty *et al.* (2000). Esta caracterización, basada en análisis de hibridación Southern, demostró que en ***B2***, adicional a los insertos de DNA presentes en su línea parental (***BG***, MON-531-6), se había integrado una copia de DNA del fragmento de restricción utilizado para la transformación. En este estudio, en el cual se realizaron análisis de PCR seguidos de secuenciación al inserto en ***B2***, se confirmaron los hallazgos previos demostrando el orden esperado de los elementos contenidos en el inserto del evento ***B2***. Además, se obtuvo la secuencia de DNA del inserto completo en el evento mencionado, la cual fue idéntica a lo previamente reportado **(ANEXO 3. MSL 17099 Confirmación secuencias flanqueantes Bollgard II MON-15985-7).**

El evento **Solución Faena Flex® (MON-88913-8) (*RF*)** fue generado mediante la integración estable de dos "cassettes" de expresión del gen *cp4 epsps* en el genoma del algodón, utilizando el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens.* Los datos muestran que ***RF*** contiene una copia del DNA insertado en un *locus* simple de integración dentro del fragmento de restricción ~13.0 kb *Spe*I que contiene dos "cassettes" de expresión del gen *cp4 epsps* intactos. No se detectaron elementos adicionales del vector de transformación PV-GHGT35 en el genoma del algodón ***RF***. La segregación mendeliana del fenotipo esperado en ***RF*** a través de múltiples generaciones, corrobora el análisis molecular de la estabilidad del inserto y establece el comportamiento genético del DNA insertado en un *locus* simple **(ANEXO 4. MSL 19580 Análisis molecular de Solución Faena Flex MON-88913).**

El evento ***B2RF*** se desarrolló por medio de la cruza tradicional de los eventos ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8). No hay bases científicas que apoyen que las secuencias serían intrínsecamente más inestables cuando se combinan por técnicas de mejoramiento tradicional. La estabilidad de cada inserto en el evento apilado ha sido comprobada por métodos científicos estándares. La estabilidad de los insertos individuales en el evento apilado fue analizada después de generaciones múltiples de algodón ***B2RF***. El análisis de hibridación Southern confirmó la presencia de los eventos individuales usando ADN extraído de la octava generación (BC_4F_4) de ***B2RF***. El patrón de hibridación obtenido del evento apilado fue consistente con los reportados previamente para los eventos individuales, por lo que se concluyó que el evento apilado contiene ambos eventos individuales **(ANEXO 5. MSL-22368 Southern Blot confirma *B2* y *RF* en *B2RF*).**

EXPRESIÓN

Se evaluaron los niveles de las proteínas CP4 EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII y GUS en tejido foliar y semillas colectadas de plantas de algodón ***B2RF***, y los eventos individuales y plantas convencionales producidas en cuatro localidades en Estados Unidos durante la temporada 2004 (Mozaffar *et al*., 2005). Las semillas son relevantes por su importancia en cuanto a seguridad de productos para alimento humano y animal. Los niveles proteicos se calcularon en base a métodos de ELISA desarrollados y validados para cuantificar cada proteína.

Niveles de la proteína CP4 EPSPS

Los niveles medios de proteína CP4 EPSPS en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 1700 y 1300 μg/g peso seco en tejido foliar y 310 y 330 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de CP4 EPSPS para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína Cry1Ac

Los niveles medios de proteína Cry1Ac en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 14 y 11 μg/g peso seco en tejido foliar y 1.8 y 1.8 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de Cry1Ac para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína Cry2Ab

Los niveles medios de proteína Cry2Ab en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 150 y 130 μg/g peso seco en tejido foliar y 270 y 230 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de Cry2Ab2 para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína NPTII

Sólo una de doce muestras de tejido foliar de ***B2RF*** y sólo una de diez muestras de tejido foliar del control en cuatro sitios muestreados mostraron niveles cuantificables de proteína NPTII (26 y 20 μg/g peso seco, respectivamente). Los niveles medios de proteína NPTII en semilla en cuatro sitios para ***B2RF*** y su control fueron 3.4 y 2.9 μg/g peso seco, respectivamente. Los niveles de NPTII para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína GUS

Los niveles medios de proteína GUS en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 1400 y 1100 µg/g peso seco en tejido foliar y 130 y 120 µg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de GUS para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Las muestras colectadas de plantas biotecnológicas y controles, sembradas en las pruebas de campo en Estados Unidos durante el 2004, fueron representativas de algodón comercial. Por lo tanto, los datos de niveles de proteínas son representativos de los niveles esperados en los cultivos de algodón comercial. Estos resultados confirman que la expresión de las cinco proteínas en tejidos de ***B2RF*** es comparable a la de los eventos individuales. Como se esperaba, la proteína AAD no se detectó en ninguna muestra, ya que este gen se encuentra bajo el control de un promotor bacteriano.

De acuerdo a los análisis de hibridación Southern del evento ***B2RF***, la estructura molecular de los insertos se ha conservado en el producto apilado, incluyendo los puntos de inserción. Los estudios realizados previamente sobre secuencias flanqueantes del inserto en los eventos ***B2*** y ***RF*** no revelaron riesgos en relación a posibles proteínas de fusión. Por lo tanto, no se espera la expresión de dichas proteínas en plantas de algodón ***B2RF*.**

Se realizaron análisis ELISA a semilla de los diferentes eventos con características de resistencia a lepidópteros obtenidas de ensayos en múltiples localidades en México en 2007. ***Se observaron niveles similares de las proteínas Cry1Ac para los eventos Bollgard®, Bollgard®/Solución Faena® y Bollgard®II/Solución Faena Flex® entre las muestras de diferentes regiones. Además se obtuvieron niveles comparables de la proteína Cry2Ab en las muestras de semillas de B2RF entre las diferentes regiones*** **(ANEXO 6. RA 07-RA-60-02, Niveles de proteínas GM en hoja de algodón México 2007).** Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las pruebas de campo en Estados Unidos durante 1999 **(ANEXO 7. MSL-16614, Niveles de proteínas GM en algodón USA 1999)** y 2004 **(ANEXO 8. MSL-19892, Niveles de proteínas GM en algodón USA 2004)** donde se encontró que la expresión de las dos proteínas *Bt* (Cry1Ac y Cry2Ab) fue comparable entre regiones mediante detección inmunológica.

La eficacia insecticida se ha mantenido durante el desarrollo de los eventos de algodón biotecnológico, desde su comercialización en 1996 y seguida a partir de 2004 con ***B2***; al igual que la calidad de la semilla, que se ha mantenido después de la transferencia del gen *cry1Ac* y de la construcción con *cry1Ac* y *cry2Ab* dentro de distintas variedades comerciales.

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

MAPA DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA

a) *Para la obtención del algodón **Bollgard® (MON-531-6)** se utilizó como organismo vector la bacteria Agrobacterium tumefaciens mediante el plásmido PV-GHBK04 **(Figura 6).** La caracterización molecular demostró que se integraron dos insertos de DNA-T (DNA transferido) dentro del genoma del algodón para producir Bollgard®, evento MON-531.*

El plásmido vector utilizado dentro de *A. tumefaciens* para producir el algodón **Bollgard® (MON-531-6)**, 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* está bajo el control transcripcional del 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 estreptomicina. 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 ***BG***.

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.

La construcción del vector PV-GHBK04, de un solo borde (derecho), integra dos genes (incluyendo el marcador selectivo NPT II) y se introdujo al organismo donador mediante el sistema ABI. La descripción de los genes quiméricos se detalla bajo el siguiente orden: promotor, región codificadora y región 3' terminal no traducida.

- **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* subsp. *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 conglicinina 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 (Fraley, *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 (Fraley, *et al.*, 1983).

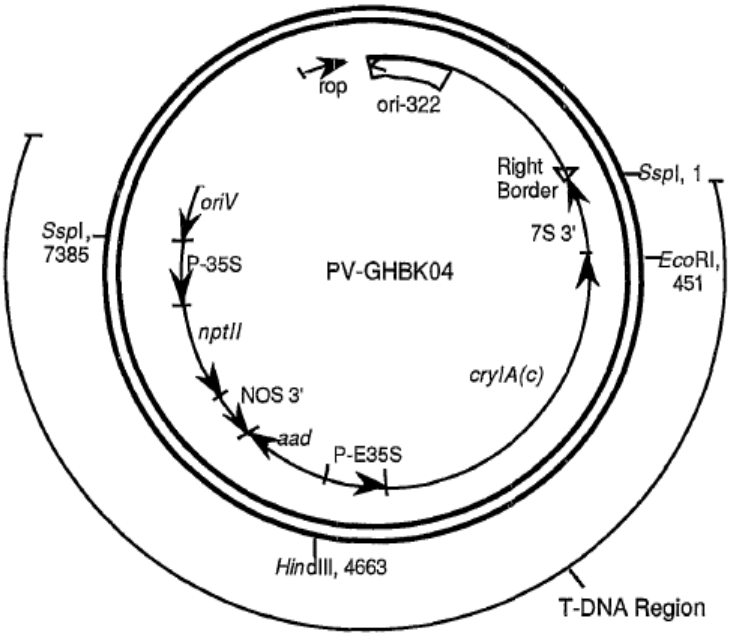


Figura 6. Mapa de la construcción genética del plásmido PV-GHBK04 utilizado en la transformación genética del algodón Bollgard®.

b) El algodón ***Bollgard®II (MON-15985-7)*** *se obtuvo mediante la transferencia de los genes cry2Ab2 y uidA al algodón Bollgard® variedad DP 50 B (que contenía los genes cr1Ac, npt II y aad).*

El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón Bollgard® DP 50 B (portadora del gen *cry1Ac*) fue el de "biobalística" (John *et al*. 1997) utilizando el plásmido PV-GHBK11 **(Figura 7).**

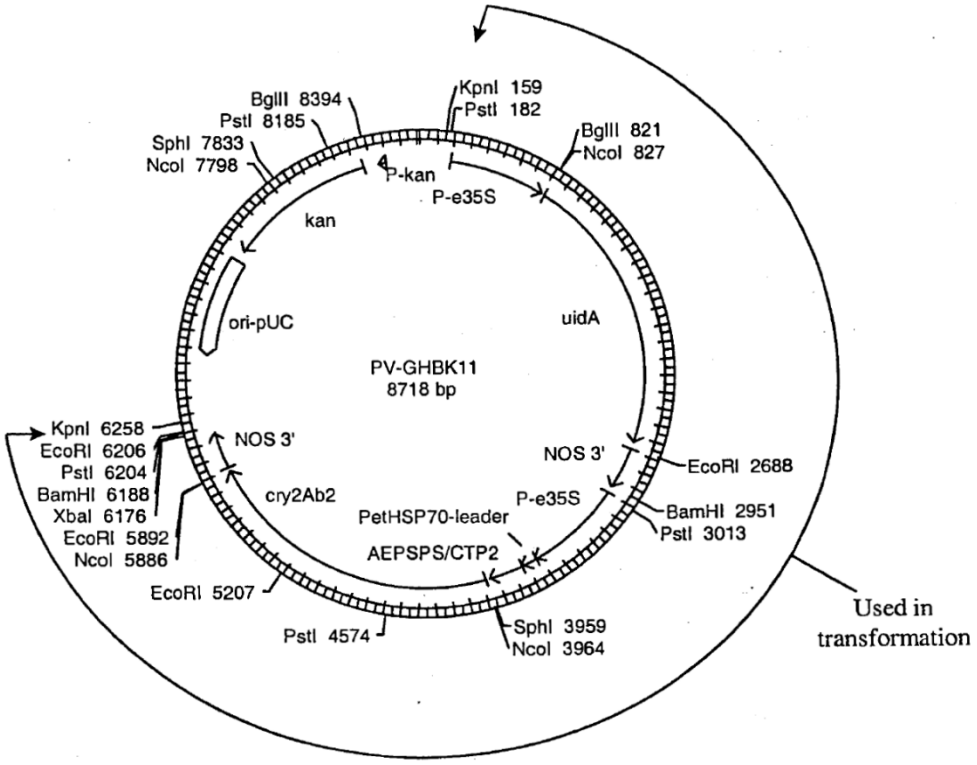


Figura 7. Mapa de la construcción genética del plásmido PV-GHBK11 utilizado para introducir el gen *Cry2Ab* en plantas de algodón portadoras del gen Bollgard® (*cry1Ac*).

c) *Para obtener el algodón **Solución Faena Flex® (MON-88913-8)** se utilizó como vector la bacteria Agrobacterium tumefaciens mediante el plásmido PV-GHGT35 **(Figura 8).***

En el algodón ***B2RF*** 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 ***B2RF*** 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 RNAm de *cp4 epsps* también proviene de otras especies vegetales.

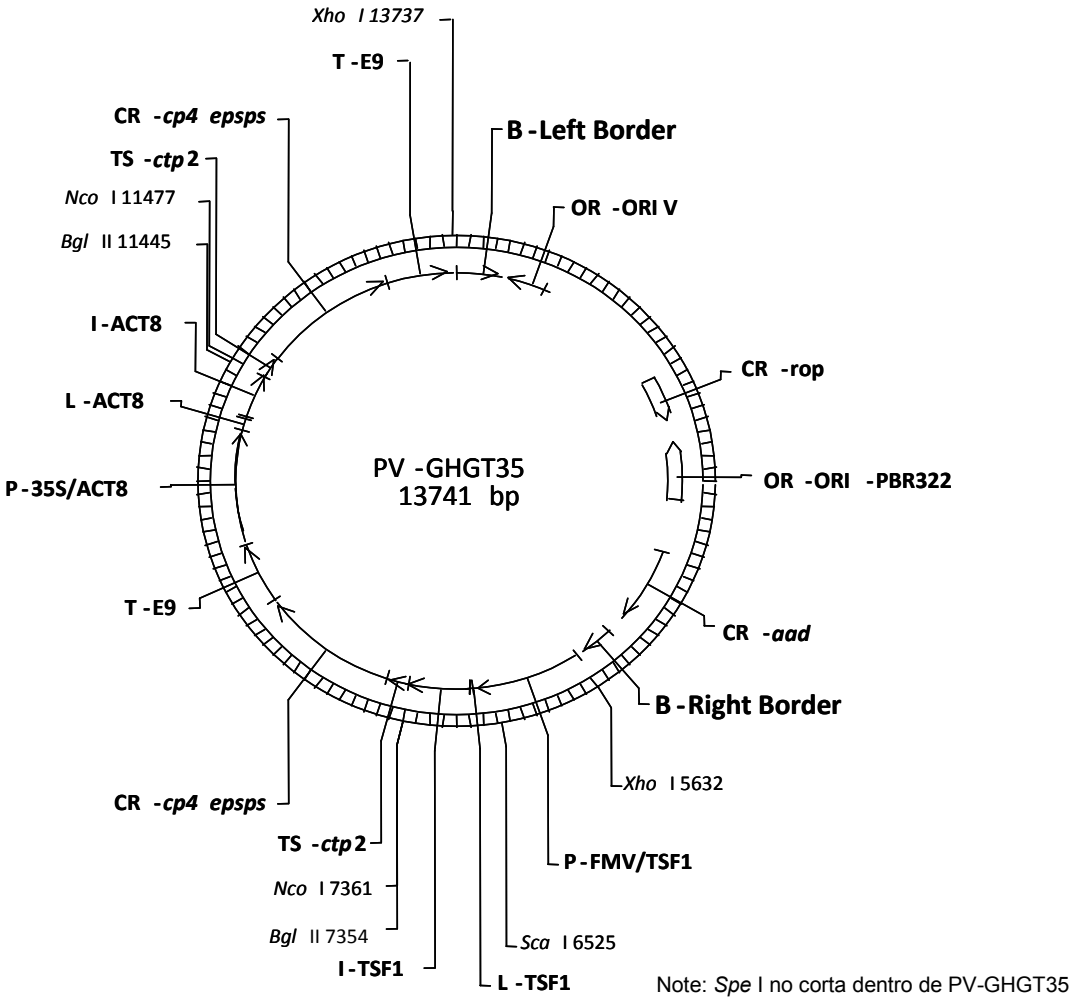


Figura 8. Mapa del plásmido vector PV-GHGT35.

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

Este evento contiene todos los genes presentes en los eventos Bollgard®II y Solución Faena Flex®. Estos incluyen los genes *cry1Ac*, *cry2Ab* y dos copias de *cp4 epsps*.

TIPO DE HERENCIA DE LOS CARACTERES

El evento ***B2RF*** **(MON-15985-7 x MON-88913-8)** se desarrolló por medio de la cruza tradicional de los eventos ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8). No hay bases científicas que apoyen que las secuencias serían intrínsecamente más inestables cuando se combinan por técnicas de mejoramiento tradicional. La estabilidad de cada inserto en el evento apilado ha sido comprobada por métodos científicos estándares.

La estabilidad de los insertos individuales en el evento apilado fue analizada después de generaciones múltiples de plantas de algodón ***B2RF***. El análisis de hibridación Southern confirmó la presencia de los eventos individuales usando ADN extraído de la octava generación (BC_4F_4) de ***B2RF*****.** El patrón de hibridación obtenido del evento apilado fue consistente con los reportados previamente para los eventos individuales, por lo que se concluyó que el evento apilado contiene ambos eventos individuales **(ANEXO 5. MSL-22368 Southern Blot confirma *B2* y *RF* en *B2RF*).**

La estabilidad genética de los eventos simples (***B2*** y ***RF****),* fue comprobada anteriormente. El análisis de hibridación Southern de las generaciones R5 y R6 del algodón ***BG*** (MON-531-6) (que fue **transformado con Cry2Ab para desarrollar Bollgard®II**) indicó un patrón de hibridación idéntico, lo que indica la estabilidad del inserto funcional del gen *cry1Ac* **(ANEXO 9. MSL-17469 Southern Blot Bollgard®)**.

Se analizaron las generaciones R1, R2, R3, R4 y BC_2F_3 de ***B2*** (MON-15985-7) mediante hibridación Southern, dando lugar a un patrón de hibridación idéntico. Estos resultados prueban la estabilidad del inserto funcional del gen *cry2Ab2* **(ANEXO 10. MSL-16749 Análisis Molecular de Bollgard®II)**.

Se realizó un análisis de hibridación Southern a lo largo de cinco generaciones de algodón ***RF***. Durante los ensayos se comprobó que este evento contiene una sola copia del inserto en un solo locus de integración, el cual a su vez contiene dos copias intactas del gen *cp4 epsps* y no se encontraron secuencias adicionales del plásmido usado en la transformación. Además, se realizaron análisis de PCR y secuenciación para identificar los sitios de inserción y las regiones flanqueantes 5´ y 3´ del genoma del algodón, adyacentes a la construcción. Esto confirma la organización correcta de los elementos de la construcción y la estabilidad del evento en múltiples generaciones **(ANEXO 4. MSL-19580, Análisis Molecular de *RF*).**

Los datos de segregación para los eventos ***B2*** y ***RF*** son consistentes con los sitios de inserción individuales de cada inserto en el genoma del algodón y segregan mendelianamente. Se comprobó que los datos de segregación y estabilidad son consistentes con los análisis de hibridación Southern previos que demuestran la estabilidad de las secuencias insertadas de ***B2*** y ***RF*** en ***B2RF***.

Los análisis de segregación demostraron patrones de herencia Mendeliana de las características de tolerancia a glifosato y de resistencia a insectos después de autopolinización o retrocruzamiento de los eventos ***B2RF*** con otras variedades de algodón. La tolerancia al glifosato y la resistencia a insectos se han mantenido durante el desarrollo de estos eventos desde sus inicios a la fecha, al igual que la calidad de la semilla, que se ha mantenido después de la transferencia de los eventos dentro de distintas variedades comerciales. De acuerdo con estos resultados, ***no existe evidencia de inestabilidad genética de los eventos de algodón B2 o RF.*** Estos datos confirman también que las construcciones genéticas que confieren las características ***B2*** y ***RF*** están integradas establemente en el genoma del algodón del evento apilado ***B2RF.***

Es poco probable que ocurra recombinación entre los insertos de ADN en el algodón ***B2RF***. Este hecho es apoyado por los estudios de estabilidad genética que muestran que se ha encontrado ADN modificado genéticamente de ***B2*** y ***RF*** en ***B2RF*** por varias generaciones sin diferencias en los patrones de bandas observados (análisis de hibridación Southern).

Si se llevara a cabo la recombinación, ésta afectaría secuencias genéticas localizadas en diferentes lugares del ADN genómico y, muy probablemente, resultaría en translocaciones cromosomales con consecuencias letales o al menos disminución de la capacidad de supervivencia para las células afectadas y su progenie. Además, tales rearreglos tendrían que suceder en una fase temprana del desarrollo de la planta o la semilla para tener efectos significativos. Mientras más tarde ocurra, menor será el número de células vegetales afectadas. Dado que este tipo de recombinación es poco probable y tiene muchas posibilidades de producir líneas celulares no viables, es extremadamente poco probable que el producto recombinado origine alguna línea celular reproductiva.

En el caso altamente improbable en el cual ocurriera recombinación que involucrara los insertos en el evento ***B2RF***, éste sería un proceso de translocación entre las secuencias que son homólogas entre los insertos de ***B2*** y ***RF***, limitadas al promotor 35S y la secuencia del péptido líder *ctp2*. La única consecuencia posible sería la modificación del nivel de expresión de los genes afectados y no una modificación de la calidad de la proteína producida. Incluso si este evento hipotético sucediera, afectaría sólo unas pocas semillas y, por lo tanto, la cantidad total de proteínas resultantes de este raro evento seguirían siendo extremadamente bajas y el nivel de exposición a dichas proteínas no cambiaría significativamente. Debido a la seguridad demostrada de las proteínas recombinantes introducidas en ***B2RF***, el riesgo que podría surgir de esta recombinación hipotética es insignificante.

Conclusión

Tomando en cuenta ***la estabilidad*** de los elementos genéticos por varias generaciones, ***la segregación mendeliana*** también por varias generaciones, ***el bajísimo potencial de recombinación entre los insertos*** en el evento ***B2RF***, y la viabilidad e idoneidad seriamente

comprometidas de las células afectadas por el evento hipotético de translocación genómica, ***el riesgo de tal recombinación es descartable***. Varios años de cultivo comercial en varios países sin observaciones de inestabilidad genética proveen más evidencia en apoyo de este hecho. ***Se concluye que los insertos de ADN en el algodón B2RF se integraron de manera estable y las características conferidas son fenotípica y genéticamente estables a través de varias generaciones y condiciones ambientales.***

EXPRESIÓN DEL MATERIAL INSERTADO

Se evaluaron los niveles de las proteínas CP4 EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII y GUS en tejido foliar y semillas colectadas de plantas de algodón ***B2RF***, y los eventos individuales y plantas convencionales producidas en cuatro localidades en Estados Unidos durante la temporada 2004 (Mozaffar *et al*., 2005). Las semillas son relevantes por su importancia en cuanto a seguridad de productos para alimento humano y animal. Los niveles proteicos se calcularon en base a métodos de ELISA desarrollados y validados para cuantificar cada proteína.

Niveles de la proteína CP4 EPSPS

Los niveles medios de proteína CP4 EPSPS en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 1700 y 1300 μg/g peso seco en tejido foliar y 310 y 330 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de CP4 EPSPS para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína Cry1Ac

Los niveles medios de proteína Cry1Ac en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 14 y 11 μg/g peso seco en tejido foliar y 1.8 y 1.8 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de Cry1Ac para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína Cry2Ab

Los niveles medios de proteína Cry2Ab en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 150 y 130 μg/g peso seco en tejido foliar y 270 y 230 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de Cry2Ab2 para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína NPTII

Sólo una de doce muestras de tejido foliar de ***B2RF*** y sólo una de diez muestras de tejido foliar del control en cuatro sitios muestreados mostraron niveles cuantificables de proteína NPTII (26 y 20 μg/g peso seco, respectivamente). Los niveles medios de proteína

NPTII en semilla en cuatro sitios para *B2RF* y su control fueron 3.4 y 2.9 µg/g peso seco, respectivamente. Los niveles de NPTII para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína GUS

Los niveles medios de proteína GUS en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 1400 y 1100 µg/g peso seco en tejido foliar y 130 y 120 µg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de GUS para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Las muestras colectadas de plantas GM y controles sembradas en las pruebas de campo en Estados Unidos durante el 2004 fueron representativas de algodón comercial. Por lo tanto, los datos de niveles de proteínas son representativos de los niveles esperados en los cultivos de algodón comercial. Estos resultados confirman que la expresión de las cinco proteínas en tejidos de ***B2RF*** es comparable a la de los eventos individuales. Como se esperaba, la proteína AAD no se detectó en ninguna muestra, ya que este gen se encuentra bajo el control de un promotor bacteriano.

De acuerdo a los análisis de hibridación Southern del evento ***B2RF***, la estructura molecular de los insertos se ha conservado en el producto apilado, incluyendo los puntos de inserción. Los estudios realizados previamente sobre secuencias flanqueantes del inserto en los eventos ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8) no revelaron riesgos en relación a posibles proteínas de fusión. Por lo tanto, no se espera la expresión de dichas proteínas en ***B2RF***.

Se realizaron análisis ELISA a semilla de los diferentes eventos con características de resistencia a lepidópteros obtenidas de ensayos en múltiples localidades en México en 2007. ***Se observaron niveles similares de las proteínas Cry1Ac para los eventos Bollgard®, Bollgard®/Solución Faena® y Bollgard®II/Solución Faena Flex® entre las muestras de diferentes regiones. Además se obtuvieron niveles comparables de la proteína Cry2Ab en las muestras de semillas de B2RF entre las diferentes regiones*** **(ANEXO 6. RA 07-RA-60-2, Niveles de proteínas GM en hoja de algodón México 2007).** Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las pruebas de campo en Estados Unidos durante 1999 **(ANEXO 7. MSL-16614, Niveles de proteínas GM en algodón USA 1999)** y 2004 **(ANEXO 8. MSL-19892, Niveles de proteínas GM en algodón USA 2004)** donde se encontró que la expresión de las dos proteínas *Bt* (Cry1Ac y Cry2Ab) fue comparable entre regiones mediante detección inmunológica.

La eficacia insecticida se ha mantenido durante el desarrollo de los eventos de algodón biotecnológico, desde su comercialización en 1996 y seguida a partir de 2004 con ***B2***; al igual que la calidad de la semilla, que se ha mantenido después de la transferencia del gen *cry1Ac* y de la construcción con *cry1Ac* y *cry2Ab* dentro de distintas variedades comerciales.

En resumen, se concluye que el ADN insertado en los eventos de algodón Solución Faena® (***SF***) y Solución Faena Flex® (***RF***), se integró de manera estable y la característica conferida es fenotípica y genéticamente estable a través de varias generaciones y condiciones ambientales. La estabilidad genética se puede confirmar también por la exitosa comercialización de las variedades de algodón ***SF*** y ***RF***.

Tomando en cuenta la información sobre la integración del material genético insertado, estabilidad de número de copias, segregación mendeliana de los rasgos a través de múltiples generaciones y expresión similar de las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS en varias regiones de diferentes países y bajo condiciones ambientales y agronómicas distintas; podemos concluir que las características resistencia a insectos y tolerancia a glifosato son estables en los diferentes eventos de algodón biotecnológico.

LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTRODUCIDAS

Las proteínas CP4 EPSPS y Cry2Ab se translocan a los cloroplastos, donde ejercen su función, mientras que Cry1Ac se localiza en el citoplasma de la célula vegetal de las plantas ***B2RF***.

I.k. Descripción del método de transformación

a) **Tecnología Bollgard®II.**

I. Algodón Bollgard®.

Para introducir el gen *Cry1Ac* a las plantas de algodón fue utilizada la cepa ABI de *Agrobacterium*; la variedad de algodón a transformar fue la Coker 312. Los procedimientos utilizados para la transformación de explantes de hipocotíleos de algodón con *Agrobacterium* fueron de acuerdo a los descritos por Umbeck *et al.*, 1987. Las plantas de algodón fueron regeneradas siguiendo el procedimiento de Trolinder y Goodin, 1987.

II. Algodón Bollgard®II.

El algodón ***B2*** (MON-15985-7) se obtuvo mediante transferencia de los genes *cry2Ab* y *uidA* al algodón biotecnológico Bollgard® variedad DP 50 B (que contenía los genes *cry1Ac*, *nptII* y *aad*). El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón Bollgard® DP 50 B (portadora del gen *cry1Ac*) fue el de “biobalística” (John *et al*. 1997) utilizando el plásmido B1579.

b) Tecnología Solución Faena Flex®.

El algodón ***RF*** fue obtenido mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* empleando el plásmido PV-GHGT35.

La línea parental del algodón ***RF*** (MON-88913-8) es la variedad de algodonero Coker 312 y el evento ***RF*** se transfirió a variedades comerciales mediante cruzamiento convencional. Se utilizó la variedad Coker 312 debido a su respuesta positiva al sistema de cultivo de tejidos usado en el proceso de producción de plantas transgénicas. Varios investigadores (Trolinder y Goodin, 1987; Umbeck, *et al.,* 1987) han demostrado que la variedad Coker 312 y un grupo de variedades relacionados a esa línea tienen una característica de respuesta favorable al cultivo de tejidos. La variedad Coker 312, aunque no se cultiva ampliamente, es un cultivar aceptado comercialmente.

El algodón ***B2RF*** se obtuvo mediante cruza convencional a partir de los eventos ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8).

c) Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

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

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

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

d) Biobalística

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

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

El algodón ***B2RF*** **(MON-15985-7 x MON-88913-8)** fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8). Por lo tanto, los fragmentos de DNA insertados en cada línea parental están presentes en el evento ***B2RF*** **(Carpeta Secuencias nucleotídicas).**

Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas se muestran en las **Tablas 2, 3 y 4**. Las representaciones esquemáticas de los insertos de ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8) y sus sitios de inserción se presentan en las **Figuras 2, 3** y **4.**

En resumen, el evento ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8) contiene las siguientes secuencias:

- El **inserto único** proveniente del genoma de la línea parental ***RF*** (MON-88913-8) **(Tabla 4 y Figura 4)** que está compuesto por los siguientes elementos:

    - El primer cassette de expresión del gen *cp4 epsps* que consiste del promotor quimérico *FMV/Tsf1* (1.04 kb), la secuencia líder *Tsf1* (0.05 kb), el intrón *Tsf1* (0.62 kb), la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto *ctp2* (0.23 kb), la secuencia codificante del gen *cp4 epsps* (1.37 kb) y la secuencia del terminador *E9* (0.64 kb).

- El segundo cassette de expresión del gen *cp4 epsps* que consiste del promotor quimérico *35S/act8* (1.17 kb), la secuencia líder *act8* (0.14 kb), el intrón *act8* (0.47 kb), la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto *ctp2* (0.23 kb), la secuencia codificante del gen *cp4 epsps* (1.37 kb) y la secuencia del terminador *E9* (0.64 kb).

- Los insertos de DNA del genoma de la línea parental ***B2*** (MON-15985-7) que está compuesto por los siguientes elementos:

  - Los **elementos genéticos asociados a la copia funcional** del inserto conteniendo el gen cry1Ac del evento ***BG*** (MON-531-6) **(Figura 2 y Tabla 2)**.
    - El cassette del gen *cry1Ac* que consiste del promotor e35S (0.6 kb), la secuencia codificante del gen *cry1Ac* (3.54 kb) y la secuencia del terminador *7S* (0.44 kb).
    - El cassette del gen *nptII* que consiste del promotor 35S (0.32 kb), la secuencia codificante del gen *nptII* (0.97 kb) y la secuencia del terminador *nos* (0.24 kb).
    - Elementos no funcionales, el origen de replicación *ori-V* (0.39 kb) y la secuencia del gen *aad* (0.79 kb).

  - Los **elementos genéticos asociados a la copia no funcional** del inserto conteniendo el gen *cry1Ac* del evento ***BG*** (MON-531-6) **(Figura 2 y Tabla 2)**.
    - La secuencia no funcional del gen *cry1Ac* (0.89 kb) y la secuencia del terminador *7S* (0.44 kb).
  - Los elementos genéticos asociados al inserto conteniendo el gen cry2Ab2 del evento ***B2*** (MON-15985-7) **(Figura 3 y Tabla 3).**

    - El cassette del gen *cry2Ab2* que consiste del promotor *e35S* (0.6 kb), la secuencia líder *Hsp 70* (0.1 kb), la secuencia codificante del gen *cry2Ab2* (1.9 kb), la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto *ctp2* (0.23 kb) y la secuencia del terminados *nos* (0.26 kb).
    - el cassette del gen *uidA* que consiste del promotor *e35S* (0.3 kb), la secuencia codificante del gen *uidA* (1.8 kb) y la secuencia del terminador *nos* (0.26 kb).

Además no se han encontrado efectos no esperados ni proteínas de fusión producto de la modificación genética de B2RF.

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

El algodón ***B2RF*** fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8), por lo tanto, expresa las siguientes proteínas novedosas provenientes de ambos eventos de transformación:

a) Proteína CP4 EPSPS.

El gen *cp4 epsps* que confiere tolerancia al glifosato [N-(fosfonometil) 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 al shikimato-3-fosfato. La enzima EPSPS es esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos y casi todos los compuestos aromáticos en las plantas, bacterias, algas y hongos, pero está ausente en mamíferos (Bentley, 1990; Eschenburg *et al*., 2002). La inhibición de la enzima EPSPS por el glifosato bloquea esta ruta metabólica, lo cual eventualmente provoca la muerte de la célula (Steinrücken y Amrhein, 1980). La proteína CP4 EPSPS es naturalmente insensible al glifosato (Padgette *et al*., 1993) tal como otras enzimas EPSPS microbianas (Schulz *et al*., 1985; Eschenburg *et al*., 2002).

La secuencia codificante del gen *cp4 epsps* fue modificada por mutagénesis dirigida para obtener una expresión óptima en plantas (Padgette *et al*., 1993). El gen nativo *cp4 epsps* contiene secuencias que podrían ser desfavorables para una expresión alta en algunas plantas. Estas secuencias incluyen sitios potenciales de poliadenilación que generalmente son ricas en A+T, un porcentaje alto de G+C del que comúnmente se encuentra en los genes de plantas dicotiledóneas (63% contra ~50%), regiones concentradas de residuos de G y C, y codones que no son de uso frecuente en los genes de las plantas dicotiledóneas. Se sintetizó una versión del gen con uso de codones preferenciales por la planta, que fue utilizada en el vector de transformación del algodón. Esta secuencia codificante fue expresada en *E. coli* con el vector *PRecA 10L* (Olins *et al*., 1988) y la actividad de la enzima EPSPS se comparó con la producida a partir del gen nativo *cp4 epsps* de *A. tumefaciens*. Los resultados establecieron que aunque la secuencia del gen fue modificada, la enzima producida por el gen modificado presenta exactamente la misma secuencia de aminoácidos que la enzima producida por *A. tumefaciens*, asimismo, su actividad también permanece inalterada.

El promotor que controla la expresión del gen *cp4 epsps* en el algodón ***B2RF*** es el promotor CMoVb (promotor 35S del virus del mosaico de la *Scrophularia*) (Richins *et al*., 1987; Gowda *et al*., 1989; Sanger *et al*., 1990). El promotor está unido a la región codificante del péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) del gen *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al*., 1987). El CTP dirige la enzima EPSPS al cloroplasto que es el sitio de biosíntesis de

aminoácidos aromáticos. En las plantas, la enzima EPSPS es sintetizada como una preproteína (ie. conteniendo el CTP) por ribosomas libres en el citoplasma celular. El precursor es transportado al interior del estroma del cloroplasto y es procesado proteolíticamente para producir la enzima madura (della-Cioppa *et al*., 1986). Una vez desprendido, el péptido de transferencia al cloroplasto se degrada rápidamente (Bartlett *et al*., 1982; della-Cioppa *et al*., 1986).

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

La proteína CP4 EPSPS se detectó mediante análisis de Western blot (reconocimiento de proteínas mediante anticuerpos específicos) en extractos de proteína de semilla de algodón Roundup Ready® (Barry *et al*., 1993). Un anticuerpo específico para la proteína CP4 EPSPS reaccionó con una proteína de 48 kD, el peso molecular esperado para la proteína menos el CTP, confirmando que este péptido es cortado durante el proceso de transporte al cloroplasto. En la **Figura 9** se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS.

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

Figura 9. **Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS presente en el algodón *B2RF*.**

b) Proteína Cry1Ac

La proteína codificada por el gen *cry1Ac* introducido en el algodón ***BG*** y ***B2*** 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) **(Figura 10).** 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-conglicinina de la soya (referido como secuencia de terminación 7S 3') (Schuler *et al.,* 1982).

La comparación de la proteína Cry1Ac expresada en el algodón ***BG*** con formulaciones insecticidas comerciales que contienen numerosas protoxinas de *Bacillus thuringiensis* fue realizada mediante análisis Western (Berberich y Fuchs, 1992). Este estudio mostró que la proteína expresada por el algodón ***BG*** es similar en peso molecular y reactividad inmunológica a una o más proteínas contenidas en los productos comerciales Dipel® (Abbott Laboratories) y Thuricide® (Sandoz Inc.). Sims (1994) demostró que la actividad biológica y especificidad de la longitud completa de la proteína Cry1Ac expresada en el algodón ***BG*** es equivalente a la proteína expresada en la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki.*

c) Proteína NPTII

El gen *nptII* fue aislado del transposón bacteriano Tn5 (Beck *et al.,* 1982). Este gen codifica para la expresión de la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII), la cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglicosídicos kanamicina y neomicina. La enzima NPTII usa el ATP para fosforilar la neomicina y la kanamicina e inactiva el antibiótico evitando su efecto en las células que producen la proteína NPTII. La proteína NPTII está ampliamente distribuida en el ambiente y las cadenas alimenticias en microorganismos resistentes a la kanamicina que se encuentran de manera natural en el suelo y en los sistemas digestivos de los mamíferos (Flavell *et al*., 1992).

La expresión del gen *nptII*, presente en los eventos de algodón biotecnológico ***BG***, ***SF***, ***BGSF***, ***B2***, ***RF*** y ***B2RF***, está controlada por el promotor CaMV 35S (Odell *et al*., 1985). La secuencia de 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 selectivo en las primeras fases de selección de células transformadas de algodón en el laboratorio (De Block *et al*., 1984; Horsch *et al*., 1984), permitiendo a las células modificadas desarrollarse en un medio de cultivo selectivo. En la **Figura 11** se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína NPTII presente en las plantas de algodón ***B2RF***.

d) Proteína AAD

El gen de resistencia a antibióticos *aad* fue aislado del transposón bacteriano Tn7 y confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomicina (Davies y Benveniste, 1974). Este gen codifica la expresión de la enzima 3'(9)-O-aminoglicósido adenililtransferasa (AAD) y está bajo el control de su propio promotor bacteriano. El gen *aad* no se expresa en las plantas de algodón GM debido a que su promotor bacteriano no es activo en plantas y los elementos reguladores necesarios para su expresión en las plantas no fueron adicionados a la construcción. El gen *aad* fue usado en el laboratorio, en la fase previa la transformación genética de las células de algodón, para seleccionar las bacterias que contenían el plásmido con el DNA de interés. En la **Figura 12** se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína AAD.

e) Proteína Cry2Ab.

El gen *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 No. Acceso X55416) tiene una longitud de 633 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 71 kDa (Widner y Whiteley, 1990; Dankocsik *et al*., 1990). La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry2Ab expresada por el algodón ***B2RF*** se presenta en la **Figura 13.**

f) Proteína GUS

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

La β-D- glucuronidasa es un exohidrolasa que cataliza la hidrólisis de una gama de β-glucurónidos en sus ácidos correspondientes y los aglicones (Oshima *et al.,* 1987), incluyendo el substrato artificial p-nitrofenil-β-D-glucurónido. La hidrólisis de este compuesto cromogénico artificial libera un tinte azul que funciona como un marcador visible y cuantificable en los procesos de transformación de la planta (Jefferson *et al*., 1987). La actividad bioquímica y catalítica de esta proteína ha sido estudiada a fondo (Wang y Touster, 1972). La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GUS según se expresa en el evento de algodón MON-15985 se presenta en la **Figura 14.**

```
   1  MDNNPNINEC IPYNCLSNPE VEVLGGERIE TGYTPIDISL SLTQFLLSEF
  51  VPGAGFVLGL VDIIWGIFGP SQWDAFLVQI EQLINQRIEE FARNQAISRL
 101  EGLSNLYQIY AESFREWEAD PTNPALREEM RIQFNDMNSA LTTAIPLFAV
 151  QNYQVPLLSV YVQAANLHLS VLRDVSVFGQ RWGFDAATIN SRYNDLTRLI
 201  GNYTDHAVRW YNTGLERVWG PDSRDWIRYN QFRRELTLTV LDIVSLFPNY
 251  DSRTYPIRTV SQLTREIYTN PVLENFDGSF RGSAQGIEGS IRSPHLMDIL
 301  NSITIYTDAH RGEYYWSGHQ IMASPVGFSG PEFTFPLYGT MGNAAPQQRI
 351  VAQLGQGVYR TLSSTLYRRP FNIGINNQQL SVLDGTEFAY GTSSNLPSAV
 401  YRKSGTVDSL DEIPPQNNNV PPRQGFSHRL SHVSMFRSGF SNSSVSIIRA
 451  PMFSWIHRSA EFNNIIASDS ITQIPAVKGN FLFNGSVISG PGFTGGDLVR
 501  LNSSGNNIQN RGYIEVPIHF PSTSTRYRVR VRYASVTPIH LNVNWGNSSI
 551  FSNTVPATAT SLDNLQSSDF GYFESANAFT SSLGNIVGVR NFSGTAGVII
 601  DRFEFIPVTA TLEAEYNLER AQKAVNALFT STNQLGLKTN VTDYHIDQVS
 651  NLVTYLSDEF CLDEKRELSE KVKHAKRLSD ERNLLQDSNF KDINRQPERG
 701  WGGSTGITIQ GGDDVFKENY VTLSGTFDEC YPTYLYQKID ESKLKAFTRY
 751  QLRGYIEDSQ DLEIYSIRYN AKHETVNVPG TGSLWPLSAQ SPIGKCGEPN
 801  RCAPHLEWNP DLDCSCRDGE KCAHHSHHFS LDIDVGCTDL NEDLGVWVIF
 851  KIKTQDGHAR LGNLEFLEEK PLVGEALARV KRAEKKWRDK REKLEWETNI
 901  VYKEAKESVD ALFVNSQYDQ LQADTNIAMI HAADKRVHSI REAYLPELSV
 951  IPGVNAAIFE ELEGRIFTAF SLYDARNVIK NGDFNNGLSC WNVKGHVDVE
1001  EQNNQRSVLV VPEWEAEVSQ EVRVCPGRGY ILRVTAYKEG YGEGCVTIHE
1051  IENNTDELKF SNCVEEEIYP NNTVTCNDYT VNQEEYGGAY TSRNRGYNEA
1101  PSVPADYASV YEEKSYTDGR RENPCEFNRG YRDYTPLPVG YVTKELEYFP
1151  ETDKVWIEIG ETEGTFIVDS VELLLMEE
```

Figura 10. **Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* (*B.t.k.*) que expresa el algodón Bollgard® línea 531 transformada con el vector PV-GHBK04 y el algodón *B2RF*.**

```
  1  MIEQDGLHAG SPAAWVERLF GYDWAQQTIG CSDAAVFRLS AQGRPVLFVK
 51  TDLSGALNEL QDEAARLSWL ATTGVPCAAV LDVVTEAGRD WLLLGEVPGQ
101  DLLSSHLAPA EKVSIMADAM RRLHTLDPAT CPFDHQAKHR IERARTRMEA
151  GLVDQDDLDE EHQGLAPAEL FARLKARMPD GEDLVVTHGD ACLPNIMVEN
201  GRFSGFIDCG RLGVADRYQD IALATRDIAE ELGGEWADRF LVLYGIAAPD
251  SQRIAFYRLL DEFF
```

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la proteína neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII) presente en las plantas de algodón *B2RF*.

```
  1  MREAVIAEVS TQLSEVVGVI ERHLEPTLLA VHLYGSAVDG GLKPHSDIDL
 51  LVTVTVRLDE TTRRALINDL LETSASPGES EILRAVEVTI VVHDDIIPWR
101  YPAKRELQFG EWQRNDILAG IFEPATIDID LAILLTKARE HSVALVGPAA
151  EELFDPVPEQ DLFEALNETL TLWNSPPDWA GDERNVVLTL SRIWYSAVTG
201  KIAPKDVAAD WAMERLPAQY QPVILEARQA YLGQEDRLAS RADQLEEFVH
251  YVKGEITKVV GK
```

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de la proteína *AAD* presente en el algodón *B2RF*.

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

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry2Ab expresada por el algodón *B2RF*. El péptido de tránsito al cloroplasto se muestra en itálicas (1-79). La proteína Cry2Ab corresponde a los aminoácidos 80-713. Los aminoácidos subrayados (77-79) corresponden a la porción esperada del péptido de tránsito a cloroplasto remanente después del procesamiento. El aminoácido en la posición 81 (D, ácido aspártico) corresponde a la secuencia introducida para fines de clonación.

1	MVRPVETPTR	EIKKLDGLWA	FSLDRENCGI	DQRWWESALQ	ESRAIAVPGS
51	FNDQFADADI	RNYAGNVWYQ	REVFIPKGWA	GQRIVLRFDA	VTHYGKVWVN
101	NQEVMEHQGG	YTPFEADVTP	YVIAGKSVRI	TVCVNNELNW	QTIPPGMVIT
151	DENGKKKQSY	FHDFFNYAGI	HRSVMLYTTP	NTWVDDITVV	THVAQDCNHA
201	SVDWQVVANG	DVSVELRDAD	QQVVATGQGT	SGTLQVVNPH	LWQPGEGYLY
251	ELCVTAKSQT	ECDIYPLRVG	IRSVAVKGEQ	FLINHKPFYF	TGFGRHEDAD
301	LRGKGFDNVL	MVHDHALMDW	IGANSYRTSH	YPYAEEMLDW	ADEHGIVVID
351	ETAAVGFNLS	LGIGFEAGNK	PKELYSEEAV	NGETQQAHLQ	AIKELIARDK
401	NHPSVVMWSI	ANEPDTRPQA	AREYFAPLAE	ATRKLDPTRP	ITCVNVMFCD
451	AHTDTISDLF	DVLCLNRYYG	WYVQSGDLET	AEKVLEKELL	AWQEKLHQPI
501	IITEYGVDTL	AGLHSMYTDM	WSEEYQCAWL	DMYHRVFDRV	SAVVGEQVWN
551	FADFATSQGI	LRVGGNKKGI	FTRDRKPKSA	AFLLQKRWTG	MNFGEKPQQG
601	GKQ				

Figura 14. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GUS.

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

Cry1Ac

La proteína Cry1Ac, producida en la línea de algodón ***BG***, es 99.4% idéntica a la proteína producida por *Bt*, cepa HD-73. Esta cepa controla insectos plaga mediante la producción de proteínas insecticidas cristalinas conocidas como delta-endotoxinas. Éstas se producen cuando la bacteria entra la fase de esporulación y pueden representar aproximadamente un tercio del peso de la célula bacteriana. Para ser activa contra el insecto blanco, la proteína debe ser ingerida por éste. En el intestino del insecto, la proteína liga receptores específicos en el mesenterón, se inserta en la membrana y forma poros ión-específicos. Estos eventos interrumpen los procesos digestivos y provocan la muerte del insecto. Se han usado cepas de *Bt* comercialmente para controlar insectos plaga seleccionados. Para esto, se preparan cantidades comerciales de estos microbios en cultivos a gran escala en los cuales se le permite esporular a la bacteria. Después, las esporas y proteínas Cry son formuladas para aplicaciones en las plantas.

Durante la esporulación de *Bt* se producen dos clases de proteínas insecticidas (delta-endotoxinas). Éstas se nombran proteínas P1 y P2 basado en sus pesos moleculares relativos. La proteína Cry1Ac de la cepa HD-73 de *Bt* se encuentra en la clase P1. Las proteínas P1 tienen un rango de pesos moleculares que can de 130 a 140 kilodaltons (kDa) y se componen de 110 a 1200 aminoácidos. Las proteínas P2 son típicamente más pequeñas que las P1. Las proteínas P2 más estudiadas son de 71 KDa y se componen por 633 aminoácidos (Widner y Whitely, 1989). Las proteínas P1 se pueden dividir en un dominio amino y uno carboxilo. Las

secuencias de aminoácidos del dominio carboxilo terminal están conservadas entre cepas bacterianas (Thorne *et al*., 1986; Jaquet *et al*., 1986) y contienen varios residuos de cisteína que forman enlaces intramoleculares que son importantes para la formación de la estructura cristalina de la proteína. El dominio carboxilo terminal no es esencial para la toxicidad hacia insectos; éste puede cortarse de la molécula de la proteína sin afectar la actividad insecticida de la proteína (Adang *et al*., 1987; Thorne *et al*., 1986).

El extremo amino terminal de la proteína P1 retiene la actividad insecticida (Pischhoff *et al.,* 1987). Comparaciones de la secuencia de aminoácidos para varias proteínas P1 de varias cepas de *Bt* revela diferencias considerables (22% de homología en contenido de aminoácidos para las subs. *kurstaki* y *tenebrionis*) que explican la selectividad en la actividad insecticida contra varios órdenes de insectos.

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

Los insectos no blanco, mamíferos, pájaros y peces no poseen estos receptores en las células epiteliales del intestino (Sacchi *et al.,* 1986; Hoffman *et al.,* 1988; Van Mellaert *et al.,* 1988). Esto tiene aplicación práctica al evaluar la seguridad de las delta-endotoxinas del *Bt* hacia organismos no-blanco. Estas proteínas muestran un rango de especificidad para insectos lepidópteros y no tienen efectos adversos en organismos no-blanco.

Cry2Ab

La bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* es una bacteria gram-positiva formadora de esporas cristalinas que se encuentra de forma natural en el suelo y se ha usado comercialmente los últimos 40 años para el control de insectos plaga (EPA, 1988). Se han identificado numerosas cepas, las cuales se han caracterizado, estudiado extensivamente y usado comercialmente ya que se ha demostrado que poseen actividad insecticida selectiva

contra insectos plaga. *Bt* está presente en productos comerciales para controlar plagas y contiene los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*. El gen *cry2Aa* se expresa en estos productos comerciales; sin embargo, el gen *cry2Ab* es un pseudogene, que aunque presente, no se expresa debido a un promotor ineficiente (Dankocsik *et al*., 1990). Por lo tanto, la proteína Cry2Ab no se expresa naturalmente en bacterias del suelo o preparaciones microbianas para aplicación en campo (Widner y Whiteley, 1990; Crickmore *et al*., 1994). Los dos genes, *cry2Aa* y *cry2Ab,* se localizan en el mismo plásmido de 100 MDa (Donovan *et al.,* 1998; 1989) y la secuencia del gen *cry2Ab* se ha caracterizado completamente (Widner y Whiteley, 1990).

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

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

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

EPSPS

La proteína CP4 EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* es una enzima que está presente en los algodones genéticamente modificados que contienen alguna de las tecnologías **Solución Faena®** y **Solución Faena Flex®.** Esta proteína les confiere la característica de tolerancia al herbicida no selectivo glifosato y participa dentro de la ruta metabólica de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, al igual que el resto de las EPSPS de todas las plantas. Sin embargo, a diferencia de las demás, CP4 EPSPS de *A. tumefaciens* es naturalmente resistente a glifosato (Duke, 1988). Esto se debe a un sitio activo reducido donde el glifosato no

encaja. De esta manera, la proteína permanece funcional en presencia del herbicida y conserva activa la producción de aminoácidos aromáticos esenciales para la vida de la planta.

La proteína CP4 EPSPS producida en el algodón ***B2RF*** y exportada a los cloroplastos, el sitio de síntesis de aminoácidos aromáticos, vía fusión N-terminal con un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP2), para formar el precursor CTP2-CP4. La proteína precursora producida en el citoplasma se procesa para remover el péptido de tránsito al ser translocada al cloroplasto, lo que resulta en la proteína CP4 EPSPS madura y funcional.

Se sintetizó una versión del gen que utiliza codones con mayor afinidad por las polimerasas vegetales y se insertó en los vectores utilizados para la transformación del algodón. Esta secuencia codificante se expresó en *E. coli* y la actividad de la proteína EPSPS se comparó con la de la proteína nativa. Los resultados demostraron que la enzima expresada a partir del gen sintético permanecía inalterada. La identidad de la proteína producida *in planta* se confirmó usando análisis de Western blot y análisis de secuencia N-terminal. En base al Western blot se encontró que la movilidad electroforética y las propiedades inmunorreactivas de la proteína aislada del algodón GM eran equivalentes a las de la proteína de referencia EPSPS producida en *E. coli*.

La información sobre caracterización bioquímica del algodón ***B2RF*** se ha presentado anteriormente en las solicitudes de salud y permisos de liberaciones experimentales. Toda información sobre este tema se puede revisar en el CD con información básica del algodón ***B2RF*** entregado junto con esta carta. Esta información se base en numerosos artículos científicos independientes donde se demuestra la inocuidad de las proteínas Cry1A, Cry2Ab, y CP4 EPSPS, sus nulas toxicidades en mamíferos y sus equivalencias sustanciales respecto de algodón convencional.

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

PROTEÍNAS Cry1Ac y Cry2Ab

La expresión de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac en el algodón ***B2*** y ***B2RF***, está regulada mediante promotores constitutivos, debido a lo cual, la mayoría de los tejidos de las plantas de algodón de estos eventos producen dichas proteínas a todo lo largo del desarrollo del cultivo. Como consecuencia de lo anterior, los residuos de plantas post-cosecha de este cultivo mejorado pueden contener pequeñas cantidades de las proteínas con actividad insecticida. Al tiempo de la cosecha, partes de las plantas tales como los tallos, restos de hoja, y cápsulas no cosechadas son fragmentados y arados para incorporarlos al suelo a fin de promover su descomposición. La EPA de Estados Unidos llevó a cabo una evaluación ambiental de las

proteínas *Bt*, incluyendo Cry1Ac y Cry2Ab entre otras proteínas *Bt*, no encontrando impactos significativos (EPA, 1998). Se ha observado que los cristales de las proteínas *Bt* se degradan rápidamente en el campo debido al efecto de la radiación solar y de la temperatura (USDA, 1999).

El destino ambiental de proteínas *Bt* purificadas que tienen un alto grado de similitud a las expresadas por ***B2*** y ***B2RF*** ha sido extensamente estudiado. La literatura publicada ha demostrado que la absorción de las proteínas *Bt* en el suelo es rápida y completa en un lapso de sólo 30 minutos (Venkateswerla y Stotzky, 1992). Asimismo, se han realizado numerosos estudios sobre la biodegradación y secuestro de las proteínas *Bt* (Tapp *et al.,* 1994; Tapp y Stotzky, 1995, 1998; Crecchio y Stotzky, 1998; Koskella y Stotzky, 1997). Todos estos estudios han demostrado que las proteínas *Bt* aisladas pueden unirse a partículas de arcilla y ácidos húmicos en mezclas artificiales de suelo.

Estudios publicados más tarde han confirmado que el impacto en la flora del suelo de las proteínas Cry, proveniente del uso de cultivos derivados de la biotecnología que producen proteínas *Bt*, es inexistente o despreciable; incluyendo la determinación *in vitro* de que no existe actividad microbiocida o microbiostática en contra de bacterias seleccionadas, hongos y algas (Koskella y Stotzky, 1997). Asimismo, no se observó efecto aparente en gusanos del suelo, nemátodos, protozoos, bacterias y hongos. Los estudios del destino y efectos de las proteínas Cry en el suelo indican que no hubo efectos adversos en actividad microbiana, biomasa o diversidad de acuerdo a mediciones utilizando análisis de polimorfismo del largo de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP).

En experimentos preliminares, se colocaron plantas de algodón *Bt* en suelos naturales hasta lograr su descomposición. En dichos experimentos se pudo registrar que las endotoxinas de *Bt* producidas *in planta* persistieron y retuvieron su actividad inmunológica y biológica en niveles similares a los observados para las endotoxinas de *Bt* producidas microbianamente (Pratt *et al*., 1993).

En 1998 se llevó a cabo una evaluación ambiental para estudiar el efecto del algodón transgénico expresando una endotoxina de *Bt* en microorganismos del suelo. Las concentraciones de la endotoxina en las muestras fueron determinadas inmunológicamente mediante ensayos ELISA conforme al método de Palm *et al*. (1996). Los niveles poblacionales de bacterias cultivables y hongos se determinó mediante la siembra de muestras en medios selectivos (Donegan *et al*., 1998). Las colonias bacterianas fueron recultivadas, teñidas mediante tinción de Gram, e identificadas bioquímicamente basados en la utilización de sustratos de 95 diferentes fuentes de carbono en placas biológicas microtiter Gram-positivas y Gram-negativas.

Los resultados mostraron la ocurrencia de cambios en los niveles de bacterias cultivadas aeróbicas del suelo, hongos y protozoos. Las poblaciones fueron significativamente mayores en los tratamientos que contenían algodón transgénico en comparación con el algodón parental convencional. Se sugirió que las plantas transgénicas se descomponen más rápidamente que las plantas parentales, y por lo tanto, proveían de nutrientes también de forma más rápida para el crecimiento bacteriano (Donegan *et al*., 1998). Se ha registrado un incremento significativo de 100 y hasta 1000 veces mayor en las poblaciones microbianas en estudios de degradación de proteínas producidas por tejidos de algodón en comparación con estudios con proteínas purificadas (Donegan *et al.,* 1995). La EPA de Estados Unidos llevó a cabo un estudio de degradación de proteína con tejido de algodón Bollgard®, mostrando una vida media de entre 4 a 7 días (Palm *et al.,* 1993; 1994; 1996). No se han identificado los factores que podrían influir en la biodegradabilidad de la planta. Debido a ello, no se han llevado a cabo estudios para monitorear biodegradabilidad de componentes más allá de la proteína Cry2Ab.

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

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

El reporte de degradación en suelos (Dubelman *et al*., 2001) demuestra que la proteína Cry2Ab se degrada rápidamente en el suelo, al igual que otras proteínas Cry estudiadas. Se mezclaron hojas de algodón ***B2*** liofilizadas que contenían las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac con suelos arenosos típicamente encontrados en las zonas de cultivo del algodón en Estados Unidos. Las muestras fueron incubadas a aproximadamente 25°C por un lapso de hasta 56 días. La cantidad de actividad insecticida en el suelo fue evaluada mediante bioensayos de

incorporación en la dietas de insectos. Se pudo estimar que la vida media de la actividad insecticida en el suelo era de 2.3 días y que el tiempo estimado de disipación para alcanzar el 90% de reducción de la concentración original (DT_{90}) era de 15 días. Estas tasas de disipación se encuentran dentro del rango de valores de disipación publicados para Cry1Ac en tejidos de algodón (2.2 – 40 días conforme a lo citado en el reporte). Aunque el método de bioensayo de insectos no puede distinguir entre la actividad biológica de cada una de las dos proteínas, si se pudo determinar que no había virtualmente actividad alguna detectable en las 3 últimas muestras de incubación a 42, 49 y 56 días.

Cabe destacar que la dosis empleada en el estudio de degradación en el suelo realizado con algodón ***B2*** descrito anteriormente fue llevado a cabo a una tasa mucho mayor de tejido de hoja que lo que podría esperarse si la biomasa aérea fuera el único contribuyente al contenido de tejido en el suelo. Basados en la tasa de expresión más alta encontrada en los estudios de campo de 1998 de 49.4 μg de la proteína por gramo seco de hoja de algodón ***B2*** (Kolwyck *et al*., 1999), se estima conservadoramente que el nivel de la proteína Cry2Ab2 agregada a las primeras 3 pulgadas de suelo en un campo típico de algodón con 60 mil plantas por acre y un promedio de tejido seco de 238 g por planta sería de 2.29 μg de la proteína Cry2Ab2 por gramo de suelo seco. Las concentraciones en el suelo de la proteína Cry2Ab2 empleadas en el estudio anteriormente mencionado fueron dos veces mayores que las estimadas en el "peor escenario" estimado de contenido en el suelo. Esta alta concentración en el suelo provee una concentración de proteína inicial tal que las mediciones cuantitativas detectables del bioensayo de insectos pudieron obtenerse por varias semanas luego de la aplicación inicial al suelo para permitir el cálculo apropiado de las tasas de disipación (DT_{50} y DT_{90}). Adicionalmente, el tejido de hoja de algodón ***B2*** fue mezclado de tal forma, que simulara una situación en que el total de la carga potencial llegara al suelo, nuevamente considerando el peor escenario posible.

Otros estudios de degradación en el suelo con la proteína Cry1Ac compararon la tasa de degradación de proteína pura versus proteína producida en tejido de algodón. Los resultados demostraron que la degradación en el suelo de la proteína producida en el tejido de algodón era un poco más lenta que en el caso de la proteína purificada. Basándose en estos resultados, los experimentos que se llevaron a cabo utilizaron sólo tejido de hoja liofilizado, que se anticipó proporcionaría el estimado más conservador de degradación en el suelo. Se consideró que la tasa exagerada de concentración provista en el suelo es suficiente para dar cuenta de todas las rutas potenciales de incorporación de las proteínas en el suelo, incluyendo la exudación si ello fuera a ocurrir. El estudio ya referenciado con la proteína Cry1Ac fue conducido utilizando una metodología similar de bioensayos de insectos para medir la actividad insecticida presente en el suelo. En efecto, se agregó proteína Cry1Ac o polvo de tejido de hoja de algodón liofilizada que contenía la proteína Cry1Ac al suelo típico de las áreas de cultivo de algodón en Estados Unidos. Las muestras fueron incubadas a aproximadamente 24°C por hasta 54 días. La proteína Cry1Ac se disipó con una vida media estimada de 9.3 a 20.2 días.

La proteína Cry1Ac agregada al suelo como componente de hojas de algodón en concentración de 0.01 g peso seco/g de suelo se disipó con una vida media de 41 días (Ream, 1994).

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

El peso de la evidencia de la literatura publicada sobre el destino y efectos de las proteínas Bt en el suelo, incluyendo las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab expresadas por el algodón B2RF, apoyan la conclusión de que las proteínas Bt constituyen un riesgo despreciable a los microorganismos del suelo.

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

El algodón ***B2RF*** fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8). Por lo tanto, los fragmentos de DNA insertados en cada línea parental están presentes en ***B2RF*** **(Carpeta Secuencias nucleotídicas)**.

Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas se muestran en las **Tablas 2, 3 y 4**. Las representaciones esquemáticas de los insertos de ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8) y sus sitios de inserción se presentan en las Figuras **2, 3** y **4**.

En resumen, el evento ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8) contiene las siguientes secuencias:

- El **inserto único** proveniente del genoma de la línea parental ***RF*** (MON-88913-8) **(Tabla 4 y Figura 4)** que está compuesto por los siguientes elementos:

    - El primer cassette de expresión del gen *cp4 epsps* que consiste del promotor quimérico *FMV/Tsf1* (1.04 kb), la secuencia líder *Tsf1* (0.05 kb), el intrón *Tsf1* (0.62 kb), la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto *ctp2* (0.23 kb), la

secuencia codificante del gen *cp4 epsps* (1.37 kb) y la secuencia del terminador *E9* (0.64 kb).

- El segundo cassette de expresión del gen *cp4 epsps* que consiste del promotor quimérico *35S/act8* (1.17 kb), la secuencia líder *act8* (0.14 kb), el intrón *act8* (0.47 kb), la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto *ctp2* (0.23 kb), la secuencia codificante del gen *cp4 epsps* (1.37 kb) y la secuencia del terminador *E9* (0.64 kb).

- Los insertos de DNA del genoma de la línea parental ***B2*** (MON-15985-7) que está compuesto por los siguientes elementos:

  - Los **elementos genéticos asociados a la copia funcional** del inserto conteniendo el gen cry1Ac del evento ***BG*** (MON-531-6) **(Figura 2 y Tabla 2)**.
    - El cassette del gen *cry1Ac* que consiste del promotor e35S (0.6 kb), la secuencia codificante del gen *cry1Ac* (3.54 kb) y la secuencia del terminador *7S* (0.44 kb).
    - El cassette del gen *nptII* que consiste del promotor 35S (0.32 kb), la secuencia codificante del gen *nptII* (0.97 kb) y la secuencia del terminador *nos* (0.24 kb).
    - Elementos no funcionales, el origen de replicación *ori-V* (0.39 kb) y la secuencia del gen *aad* (0.79 kb).

  - Los **elementos genéticos asociados a la copia no funcional** del inserto conteniendo el gen *cry1Ac* del evento ***BG*** (MON-531-6) **(Figura 2 y Tabla 2)**.

    - La secuencia no funcional del gen *cry1Ac* (0.89 kb) y la secuencia del terminador *7S* (0.44 kb).

  - Los elementos genéticos asociados al inserto conteniendo el gen cry2Ab2 del evento ***B2*** (MON-15985-7) **(Figura 3 y Tabla 3)**.

    - El cassette del gen *cry2Ab2* que consiste del promotor *e35S* (0.6 kb), la secuencia líder *Hsp 70* (0.1 kb), la secuencia codificante del gen *cry2Ab2* (1.9 kb), la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto *ctp2* (0.23 kb) y la secuencia del terminados *nos* (0.26 kb).
    - el cassette del gen *uidA* que consiste del promotor *e35S* (0.3 kb), la secuencia codificante del gen *uidA* (1.8 kb) y la secuencia del terminador *nos* (0.26 kb).

La proteína EPSPS nativa del algodón (plantas y microorganismos la poseen) es homóloga de la CP4 EPSPS de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* introducida en el evento ***RF*** (MON-88913-8) que es una de las líneas parentales del evento ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8). Sin embargo, la EPSPS nativa del algodón no es tolerante al herbicida glifosato y se inhibe al contacto con éste, interrumpiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina). Ninguna secuencia componente de los insertos de los eventos de transformación está presente de manera natural en el algodón convencional.

El evento de algodón ***B2RF*** no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional. Los datos que apoyan esta afirmación provienen de cientos de pruebas de campo llevadas a cabo desde 2002, en Australia, Argentina, costa Rica, México, Sudáfrica y Estados Unidos (incluyendo Puerto Rico), para probar sus características agronómicas, parámetros fenotípicos y eficacia. De esta manera, las únicas características que difieren entre el algodón ***B2RF*** y las variedades convencionales son la resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosato, como se esperaba de acuerdo al diseñado.

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

Bacillus thuringiensis

La bacteria *B. thuringiensis* es un microorganismo del suelo, Gram-positivo, que forma esporas y se puede encontrar en ambientes de todo el mundo, incluso en México (Slatin y Português, 1992, Kaji et al., 1994). Además de la producción de esporas, estas bacterias también se caracterizan por la producción de cristales de proteína durante el proceso de esporulación. La propiedad insecticida de *B. thuringiensis* es conferida por las proteínas presentes en los cristales (proteínas Cry). Hay varias clases de proteínas que pueden agruparse de acuerdo a la especificidad de su espectro. Las proteínas Cry actividad contra los insectos del orden *Diptera* (mosquitos y moscas) son producidas por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*; las proteínas activas contra insectos coleópteros (escarabajo de la papa) son producidas por *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, y las proteínas activas contra los insectos del orden *Lepidoptera* (larvas del tabaco, algodón, etc.) son producidas por cristales de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *sotto* y *aizawai*, entre otros. Las proteínas insecticidas producidas por *B. thuringiensis* se han estudiado durante años en cuanto a su especificidad, toxicidad y modo de acción (Nester *et al.,* 2002). La exposición de los organismos vivos y el medio ambiente a las proteínas producidas por *B. thuringiensis* es un evento que se produce en abundancia en la naturaleza.

El mecanismo general de la actividad insecticida de las proteínas Cry está bien caracterizado (Gill *et al.,* 1992; Schnepf *et al.,* 1998). Estas proteínas contienen varios dominios funcionales con regiones altamente conservadas entre clases. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de las proteínas Cry1A está altamente conservada en los dominios I, II y III. Se ha

observado que estos dominios funcionales determinan la actividad y especificidad de las proteínas Cry. El **dominio I** está involucrado en la inserción y formación de poros en la membrana, y el **dominio II** está involucrado en el reconocimiento y unión a receptores específicos. El **dominio III** está involucrado en la unión con los receptores. Se ha observado que la combinación de los dominios I y II determina la especificidad de acción contra insectos (De Maagd *et al.,* 2001). El dominio C-terminal está involucrado en la formación de cristales, el cual no contribuye directamente en la actividad insecticida (De Maagd *et al.,* 2001). El dominio C-terminal es cortado al entrar al intestino medio del insecto, o por ciertas proteasas *in vitro.* Sólo aquellos insectos con receptores específicos son afectados, y no se observa toxicidad en especies que carecen de estos receptores (Crickmore *et al.,* 1998; De Maagd *et al.,* 2001).

Analizando la identidad en la secuencia de aminoácidos para proteínas insecticidas se puede predecir la similitud en su función biológica, por ejemplo, actividad contra un espectro similar de insectos. Se ha establecido que las proteínas Cry tienen un espectro insecticida definido dentro de un Orden (Crickmore *et al.,* 1998; De Maagd *et al.,* 2001). Este alto grado de especificidad se basa en cuatro niveles de selectividad, que llevan conjuntamente a la intoxicación (Federici, 2002). Estos niveles de selectividad son: **1)** la vía por la cual el insecto se expone a las proteínas Cry; **2)** activación de las toxinas proteicas mediante enzimas proteolíticas específicas (determinado por diferencias fisiológicas en el aparato digestivo entre insectos); **3)** unión de las toxinas a receptores en el intestino medio, y **4)** cambios en la configuración proteica. La proteína reconfigurada tiene la capacidad de ingresar a la membrana del intestino medio y formar canales. Esta actividad afecta la capacidad de las larvas de alimentarse y desarrollarse, llevando eventualmente a la muerte de los insectos susceptibles.

En consecuencia, sólo aquellos insectos con receptores específicos se ven afectados, y no se observa toxicidad en especies que carecen de estos receptores. Por ejemplo, las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F son activas contra insectos lepidópteros pero no contra coleópteros, y la proteína Cry3Bb1 es activa contra insectos coleópteros (larvas) que atacan las raíces del maíz, pero no contra lepidópteros.

Las proteínas Cry han sido utilizadas comercialmente desde 1958 como productos microbiológicos con actividad insecticida (EPA, 1988), y en cultivos derivados de la biotecnología, durante muchos años. La muy baja toxicidad de los productos insecticidas derivados de *Bt* en mamíferos ha sido demostrada en muchos estudios de seguridad, y no existen casos confirmados de reacciones alérgicas a las proteínas Cry en aplicaciones de productos microbianos derivados de *Bt*, durante los más de 50 años de uso. Hay por lo menos 180 productos microbianos comerciales basados en *Bt* en Estados Unidos, Canadá, México y varios países de América del Sur, así como en prácticamente todos los países de la Unión Europea, China, Australia y países de Europa del Este (EPA, 1998; Baum *et al.,* 1999). Los cultivos en los cuales se utilizan estas formulaciones tradicionalmente incluyen diversas hortalizas, árboles frutales, las alcachofas, cerezas y granos almacenados, tales como el trigo.

La proteína Cry1Ac producida en el caso del algodón ***BG*** (MON-531-6) es 99,4% idéntica a la proteína producida en la cepa bacteriana de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk). No se espera que el algodón MON-531, que expresa la proteína Cry1Ac, tenga mayor potencial intrínseco de causar daños al medio ambiente o a los organismos no blanco que los organismos que producen naturalmente esta proteína.

La información sobre caracterización bioquímica del algodón ***BG*** (MON-531-6) se ha presentado anteriormente en la solicitud de Salud. Esta información se basa en numerosos artículos científicos independientes donde se demuestra la inocuidad de la proteína Cry1Ac, su nula toxicidad en mamíferos y su equivalencia sustancial respecto de algodón convencional.

El gen *cry2Aa* se expresa en estos productos comerciales, sin embargo, el gen *cry2Ab* es un pseudogén, que aunque presente, no se expresa debido a un promotor ineficiente (Dankocsik *et al*., 1990). Por lo tanto, la proteína Cry2Ab no se expresa naturalmente en bacterias del suelo o preparaciones microbianas para aplicación en campo (Widner y Whiteley, 1990; Crickmore *et al*., 1994). Los dos genes, *cry2Aa* y *cry2Ab,* se localizan en el mismo plásmido de 100 MDa (Donovan et al., 1998; 1989) y la secuencia del gen *cry2Ab* se ha caracterizado completamente (Widner y Whiteley, 1990).

Como el gen *cry2Ab* no se expresa naturalmente en *Bt*, como se describe en el párrafo anterior, se clonó el pseudogene *cry2Ab* con un promotor adecuado en la cepa EG7699 de *Bt*. Posteriormente se aisló y purificó la proteína Cry2Ab, que contiene 633 aminoácidos con una masa aproximada de 71 KDa (Widner y Whiteley, 1990; Dankocsik *et al*., 1990). Se insertó un aminoácido adicional (posición 2) para crear un sitio de corte para una enzima de restricción para facilitar la clonación. Los productos proteicos de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* comparten un 88% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Widner y Whiteley, 1990; Dankocsik *et al*., 1990) y 97% de similitud (identidad de aminoácidos).

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

Al igual que Cry1Ac, la proteína Cry2Ab es selectiva para lepidópteros debido a los receptores que éstos tienen en la membrana celular de las células epiteliales del intestino. Otros organismos como insectos de otros órdenes, mamíferos, aves y peces no tienen estos receptores, por lo tanto, la proteína cry2Ab es completamente inofensiva para ellos.

Agrobacterium tumefaciens cepa CP4

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizósfera de las plantas. Únicamente el gen *cp4 epsps* de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes al herbicida Faena Ultra®. 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 ***B2RF***, ya que el aceite derivado del algodón utilizado para el consumo humano no contiene esta proteína (Fuchs, 1994).

La proteína CP4 EPSPS no presenta homología con las secuencias de aminoácidos de las proteínas tóxicas y alergénicas de las bases de datos Pir Protein, Swissprot (Bairoch y Boeckmanm, 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 ***B2RF*** tolerantes al herbicida glifosato no presenta ningún riesgo de provocar reacciones alérgicas. El aceite de la semilla de algodón es el producto más utilizado para el consumo humano y los análisis del aceite derivado de variedades ***B2RF*** confirmaron que no existe proteína CP4 EPSPS detectable en el aceite para uso industrial (Fuchs, 1994). Con base en estos resultados no se espera un consumo humano significativo de esta proteína. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS no muestra homología con ninguna de las secuencias de alérgenos en las tres bases de datos de proteínas actuales (Mitsky, 1993; Genpet, Pir protein y Swissprot) y, por lo tanto, se concluye que la proteína CP4 EPSPS no presenta ningún potencial alergénico para los

humanos. Adicionalmente, la proteína CP4 EPSPS es rápidamente desnaturalizada por el calor y la digestión enzimática y ácida en fluidos gástricos simulados (ANZFA, 2001b).

La proteína CP4 EPSPS purificada en dosis agudas de 572 mg/kg de peso corporal no produjo efectos adversos en ratones. Esta dosis representa más de 1000 veces el consumo potencial previsto de CP4 EPSPS en alimentos derivados de todos los cultivos GM expresando esta enzima bajo desarrollo por Monsanto en ese tiempo (soya, papa, tomate, maíz) (Harrison *et al.,* 1996).

Las instituciones responsables de esta evaluación en los Estados Unidos (USDA-APHIS, FDA, EPA) y México (Secretaría de Salud) han dictaminado la inocuidad del algodón **B2RF** y aprobado su consumo humano y animal.

En cuanto al algodón *Gossypium hirsutum*, receptor de los eventos ***B2*** y ***RF***, líneas parentales del algodón ***B2RF***, no presenta ni ha presentado históricamente patogenicidad o virulencia. Además, como variedad altamente domesticada, no presenta potencial de convertirse en maleza.

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

En los algodones ***BG*** (MON-531-6) y ***B2*** (MON-15985-7) se utilizó el gen ***npt-II*** como marcador de selección (resistencia a kanamicina). Este gen también se encuentra en el evento ***B2RF***, ya que para la obtención de este evento se recurrió a la cruza de los eventos ***B2*** y ***RF*** (MON-88913-8). La proteína NPT-II (neomicina fosfotransferasa) ha sido utilizada, en numerosos estudios con diferentes especies vegetales, como marcador de selección de células vegetales transformadas. De esta manera, las plantas que contienen el gen *npt-II* resisten aplicaciones del antibiótico kanamicina y se inhibe el crecimiento de las que no fueron transformadas. Así, las plantas resistentes tendrán los genes de interés, en este caso los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* (que codifican las proteínas insecticidas específicas para lepidópteros). La proteína NPT-II no es útil para ningún otro propósito y carece de propiedades insecticidas. Además se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y en la cadena alimenticia; los microorganismos resistentes a kanamicina se presentan en forma natural en el suelo y en los sistemas digestivos de mamíferos (Flavell *et al.,* 1992).

Varias autoridades regulatorias en todo el mundo han confirmado la seguridad de las proteínas NPT-II para los humanos y otros organismos cuando se ha liberado al ambiente. La Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), por ejemplo, ha exentado a la proteína NPT-II, y al material genético necesario para su producción, del

requerimiento de un rango de tolerancia cuando es usada como un ingrediente inerte de plantas modificadas para ser insecticidas (EPA, 1994).

El gen ***aad*** que codifica la enzima 3´´ (9)-O-aminoglicósido adenililtransferasa (AAD), fue utilizado en el laboratorio antes de la producción de las plantas genéticamente modificadas, para selección de bacterias que contenían el plásmido con la construcción a utilizar en la transformación del algodón. Esta proteína confiere resistencia a los antibióticos estreptomicina y espectinomicina (Davies y Benveniste, 1974). El gen ***aad*** no se expresa en plantas 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 tejidos vegetales. Este gen no codifica ninguna proteína que le confiera una nueva característica a la planta.

El gen ***uidA***, que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS), también se usa como reportero para evaluar la transferencia del material genético nuevo a la planta receptora. La enzima GUS transforma un sustrato incoloro a un producto de color azul en un ensayo sencillo y ha sido ampliamente utilizado en transformaciones de plantas como algodón, maíz y tabaco. Existe un largo historial de uso seguro de la proteína GUS. La actividad bioquímica y catalítica de esta proteína se ha estudiado minuciosamente (Wang y Touster, 1972). La exposición de seres humanos a GUS es frecuente a través de las células epiteliales y la microflora del intestino, exposición bacteriana y muchos alimentos que la contienen sin conocerse efectos dañinos (Glissen *et al*., 1998). Por otro lado, se ha detectado actividad enzimática similar a la de GUS en cerca de 50 especies vegetales en diversos tejidos que incluyen embrión, fruto, testa y endospermo (Hu *et al*., 1990). Las especies vegetales mencionadas incluyen varias que son fuente de alimento para los humanos, como papa, manzana, almendra, centeno, ruibarbo y caña de azúcar (Schulz y Weissenbock, 1987; Hodal *et al*., 1992; Wozniak y Owens, 1994). GUS también está presente en la carne de res y en especies de invertebrados como los nematodos, moluscos, caracoles e insectos (Glissen *et al*., 1998). Además, no se conocen efectos dañinos de GUS, incluso aunque sea ingerida en alimentos crudos como mariscos y los metabolitos producto de su actividad no son tóxicos (Glissen *et al.,* 1998).

Se ha demostrado por análisis Western blot y ensayos de actividad enzimática que la proteína GUS se degrada rápidamente en simulaciones de fluidos gástricos e intestinales que simulan la digestión humana. A los 15 segundos de exposición a fluidos gástricos no se detectó la proteína GUS ni por Western blot ni en ensayos de actividad enzimática. Basado en estos resultados, se concluyó que la proteína GUS, al ser ingerida por humanos, se degrada fácilmente en el tracto digestivo (Fuchs y Astwood, 1996).

De manera similar, la proteína GUS no tiene efecto insecticida y no existe evidencia de que produzca daños al ambiente. GUS está presente en las semillas de algodón en niveles bajos (0.01% del peso fresco) (Kolwyck *et al.,* 1999; Kolwyck *et al.,* 2000), entonces, virtualmente no habría exposición a esta proteína a partir de algodón GM. Dicho de otro modo,

GUS ha sido aprobada para su liberación al ambiente por su inherente falta de peligro (EPA, 2001).

El algodón ***B2RF*** también contiene dos copias de la enzima CP4 EPSPS, la cual le confiere resistencia al herbicida no selectivo glifosato. Por lo tanto, no fue necesario utilizar genes de selección adicionales en la construcción, porque la proteína CP4 EPSPS actúa como marcador de selección por sí misma. Esto es, las células resistentes a glifosato fueron exitosamente transformadas y ahora poseen la proteína bacteriana que les confiere la resistencia.

Por último, se tiene la autorización por parte de la Secretaria de Salud para los diferentes eventos de algodón biotecnológico que garantizan su inocuidad para consumo humano y animal.

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

El evento ***B2RF*** se desarrolló por medio de la cruza tradicional de ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8). No hay bases científicas que apoyen que las secuencias serían intrínsecamente más inestables cuando se combinan por técnicas de mejoramiento tradicional. La estabilidad de cada inserto en ***B2RF*** ha sido comprobada por métodos científicos estándares.

La estabilidad de los insertos, ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8), en el evento apilado ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8) fue analizada después de generaciones múltiples. El análisis de hibridación Southern confirmó la presencia de los eventos individuales usando ADN extraído de la octava generación (BC_4F_4) de ***B2RF***. El patrón de hibridación obtenido del evento apilado fue consistente con los reportados previamente para los eventos individuales, por lo que se concluyó que el evento apilado contiene ambos eventos individuales **(ANEXO 5. MSL-22368, Southern Blot confirma *B2* y *RF* en *B2RF*).**

La estabilidad genética de los eventos simples, **B2** y ***RF*** fue comprobada anteriormente. El análisis de hibridación Southern de las generaciones R5 y R6 del algodón ***BG*** (MON-531-6) (que fue transformando con Cry2Ab para desarrollar ***B2***) indicó un patrón de hibridación idéntico, lo que indica la estabilidad del inserto funcional del gen *cry1Ac* **(ANEXO 9. MSL-17469, Southern Blot Bollgard®)**.

Se analizaron las generaciones R1, R2, R3, R4 y BC_2F_3 de ***B2*** mediante hibridación Southern, dando lugar a un patrón de hibridación idéntico. Estos resultados prueban la estabilidad del inserto funcional del gen *cry2Ab2* **(ANEXO 10. MSL-16749, Análisis Molecular de Bollgard®II)**.

Se realizó un análisis de hibridación Southern a lo largo de cinco generaciones de algodón ***RF***. Durante los ensayos se comprobó que este evento contiene una sola copia del inserto en un solo locus de integración, el cual a su vez contiene dos copias intactas del gen *cp4 epsps* y no se encontraron secuencias adicionales del plásmido usado en la transformación. Además, se realizaron análisis de PCR y secuenciación para identificar los sitios de inserción y las regiones flanqueantes 5´ y 3´ del genoma del algodón, adyacentes a la construcción. Esto confirma la organización correcta de los elementos de la construcción y la estabilidad del evento en múltiples generaciones **(ANEXO 4. MSL-19580, Análisis Molecular de *RF*).**

Los datos de segregación para ***B2*** y ***RF*** son consistentes con los sitios de inserción individuales de cada inserto en el genoma del algodón y segregan mendelianamente. Se comprobó que los datos de segregación y estabilidad son consistentes con los análisis de hibridación Southern previos que demuestran la estabilidad de las secuencias insertadas de ***B2RF***.

Los análisis de segregación demostraron patrones de herencia Mendeliana de las características de tolerancia a glifosato y de resistencia a insectos después de autopolinización o retrocruzamiento de los eventos ***B2*** y ***RF*** con otras variedades de algodón. La tolerancia al glifosato y la resistencia a insectos se han mantenidos durante el desarrollo de estos eventos desde sus inicios a la fecha, al igual que la calidad de la semilla que se ha mantenido después de la transferencia de los eventos dentro de distintas variedades comerciales. De acuerdo con estos resultados, ***no existe evidencia de inestabilidad genética de los eventos de algodón B2 o RF.*** Estos datos confirman también que las construcciones genéticas que confieren las características ***B2*** y ***RF*** están integradas establemente en el genoma del algodón del evento apilado ***B2RF***.

Es poco probable que ocurra recombinación entre los insertos de ADN en el evento ***B2RF***. Este hecho es apoyado por los estudios de estabilidad genética que muestran que se ha encontrado ADN modificado genéticamente de ***B2*** y ***RF*** en el evento apilado ***B2RF*** por varias generaciones sin diferencias en los patrones de bandas observados (análisis de hibridación Southern).

Si se llevara a cabo la recombinación, ésta afectaría secuencias genéticas localizadas en diferentes lugares del ADN genómico y, muy probablemente resultaría en translocaciones cromosomales con consecuencias letales o al menos disminución de la capacidad de supervivencia para las células afectadas y su progenie. Además, tales rearreglos tendrían que suceder en una fase temprana del desarrollo de la planta o la semilla para tener efectos significativos. Mientras más tarde ocurra, menor será el número de células vegetales afectadas. Dado que este tipo de recombinación es poco probable y tiene muchas posibilidades de producir líneas celulares no viables, es extremadamente poco probable que el producto recombinado origine alguna línea celular reproductiva.

En el caso altamente improbable en el cual ocurriera recombinación que involucrara los insertos en el evento ***B2RF***, este sería un proceso de translocación entre las secuencias que son homólogas entre los insertos de ***B2*** y ***RF***, limitadas al promotor 35S y la secuencia del péptido líder *ctp2*. La única consecuencia posible sería la modificación del nivel de expresión de los genes afectados y no una modificación de la calidad de la proteína producida. Incluso si este evento hipotético sucediera, afectaría sólo unas pocas semillas y, por lo tanto, la cantidad total de proteínas resultantes de este raro evento seguirían siendo extremadamente bajas y el nivel de exposición a dichas proteínas no cambiaría significativamente. Debido a la seguridad demostrada de las proteínas recombinantes introducidas en ***B2RF***, el riesgo que podría surgir de esta recombinación hipotética es insignificante.

Conclusión

Tomando en cuenta la estabilidad de los elementos genéticos por varias generaciones, la segregación mendeliana también por varias generaciones, el bajísimo potencial de recombinación entre los insertos en el evento ***B2RF***, y la viabilidad e idoneidad seriamente comprometidas de las células afectadas por el evento hipotético de translocación genómica, el riesgo de tal recombinación es descartable. Varios años de cultivo comercial en varios países sin observaciones de inestabilidad genética proveen más evidencia en apoyo de este hecho. ***Se concluye que los insertos de ADN en el algodón B2RF se integraron de manera estable y las características conferidas son fenotípica y genéticamente estables a través de varias generaciones y condiciones ambientales.***

I.t. Referencia bibliográfica sobre los datos presentados

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

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).

ANZFA (Australian New Zealand Food Authority). 2001b. Food safety: the priority classification system for food business. Lkd.

Barry, G.F., Kishore, G.M., Padgette, S.R. and Stallings, W.C. (1997) Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. *United States Patent*, **No. 5,633,435**

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

Baum, J., Johnson, T., Carlton, B. 1999. Methods in Biotechnology. 5, Ch. 12: 189-209.

Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. y Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene, 19:327-336.

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

Berberich, S.A., Zobel, J.F. and Ream, J.E. (1993) Evaluation of protein content in refined cottonseed oil produced from the 1992 Insect Resistant Cotton field trials. *Monsanto Technical Report*, **MSL 13278**

Bevan, M., Barnes, W.M. y Chilton, M.D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucl. Acid Res. 11(2): 369-385.

Brubaker CL, Paterson AH, Wendel JF (1999) Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. Genome 42:184–203.

Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C. and Chua, N. (1984) Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J*, **3**, 1671-1679.

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., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Daen, D.H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 807-813.

Dankocsik, C.; Donovan, W. P.; Jany, C. S., 1990: Activation of a cryptic crystal protein gene of Bacillus thuringiensis subspecies kurstaki by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. Mol. Microbiol. 4, 2087–2094.

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

De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genetics*, **17**, 193-199.

della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T., & Kishore, G. M. 1986. "Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phiosphate 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.

Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 561-573.

Doherty, S.C. ; Mittanck, D.W. and Lirette, R.P. (2001) Confirmation of the genomic DNA sequence flanking the 5' and 3' ends of the cry2Ab2 insert in Bollgard II cotton event 15985. *Monsanto Technical Report* **MSL 17146**.

Donegan, K.K., C.J. Palm, V.J. Fieland, L.A. Porteous, L.M. Ganio, D.L. Schaller, L.Q. Bucao and R.J. Seidler. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* endotoxin. Appl. Soil Ecol. 2:111-124.

Donovan, W.P., Rupar, M.J., Slaney, A.C., Malvar, T., Gawron-Burke, M.C. and Johnson, T.B. (1992) Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to *coleoptera*species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3921-3927.

Dubelman, S., Martin, J.W. and Bhalgat, M.K. (2001) Aerobic soil degradation of the *Bacillus thuringiensis* insect protection protein 2 in cotton leaf tissue. *Monsanto Technical Report*, **MSL 16185**

Duke, S. O. 1988. Glyphosate. p. 1-70. in Kearney, P. C. and D. D. Kaufman, eds. Herbicides – Chemistry, Degradation, and Mode of Action. Dekker, New York.

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

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.

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

Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn*7* gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3"(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 7095-7106.

Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4803-7.

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.

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

Fuchs, R.L. 1994. Gene expression and compositional analysis from field-grown insect resistant cotton lines expressing full length *B.t.k.* HD-73 protein. Monsanto Technical Report, St. Louis, MO, USA.

Gill, S.S., E.A. Cowles, y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of Bacillus thuringiensis endotoxins. Ann. Rev. Entomol. 37:615-636.

Glissen, L.J., Metz, P.L., Stiekema, W.J. and Nap, J.P. (1998) Biosafety of *E. coli* beta-glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Res*, **7**, 157-63.

Harrison, L., M. Bailey, M. Naylor, J. Ream, B.G. Hammond, D. Nida, y B. Burnette. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolypyryvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. Journal of Nutrition 126:728-740.

Head, G., Surber, J., Watson, J., Martin, J. and Duan, J. 2002. No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use. Environmental Entomology. 31(1): 30-36.

Hodal, L., Bochardt, A., Nielsen, J.E., Mattsson, O. and Okk, F.T. (1992) Detection, expression and specific elimination of endogenous beta-glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Sci.*, **87**, 115-122.

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

Hu, C.Y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, P.D. and O'Brien, W.T. (1990) Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant cell rep.*, **9**, 1-5.

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

Kaji et al. 1994. Sys. Appl. Microbiol. 17 (1): 104-107.

Kay, R.; Chan, A.; Daly, M. e McPherson, J. 1985. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science. 236:1299-1302.

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.

Kolwyck, D., K. Hamilton, and A. Reed. 1999. Cry1Ac, CP4 EPSPS and NPTII protein levels in cotton samples produced in the 1998 U.S. field trials. Monsanto Technical Report MSL 16243.

Kolwyck, D., K. Hamilton, y A. Reed. 1999. Cry1Ac, CP4 EPSPS and NPTII protein levels in cotton samples produced in the 1998 U.S. field trials. Monsanto Technical Report MSL 16243.

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.

McCabe, D.E. and Martinell, B.J. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. Biotechnology, 11, 596-598.

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

Mozaffar, S., Bookout, J.T. and Bannon, G.A. (2005) Cry1Ac, Cry2Ab2, CP4 EPSPS, NPTII and GUS protein levels in cotton leaf and seed tissues from MON 88913 x MON 15985 produced in 2004 U.S. field trials. *Monsanto Technical Report*, **MSL 19892**

Naylor, M. W., (1993) Acute Oral Toxicity Study of CP4 EPSPS Protein in Albino Mice, Monsanto Technical Report, MSL-13077.

Nester, E., Thomashow, L., Metz, M. and Gordon, M. 2002. 100 years of Bacillus thuringiensis: a critical scientific assessment. American Academy of Microbiology: 1-22. Disponible en: www.asmusa.org.

Odell, J.T., Mag, F. y Chua, H.H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812.

Oshima *et al*. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:685-689.

Palm C.J, Donegan KK, Siedler RJ. 1994. Persistence in soil of trangenic 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.

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.

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.

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.

Percival, A.E., Wendel, J.F. and Stewart, J.M. (1999) Taxonomy and germplasm resources. *Cotton: origin, history, technology, and production.*

Rieger, R., Michaelis, A., and Green, M.M. (1976). Glossary of genetics and cytogenetics: classical and molecular. (Berlin: Springer-Verlag).

Reiser, S.E., Beazley, K.A., Petersen, E.A., Hillyard, J.R., Cavato, T.A. and Lirette, R.P. (2001) Extended molecular characterization of Bollgard cotton event 531. *Monsanto Technical Report*, **MSL 16882**

Richins, R.D., Scholthof, H.B. and Shepherd, R.J. (1987) Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Res*, **15**, 8451-66.

Richins, R.D.; Scholthof, H.B. e Shepherd, R.J. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (Caulimorvirus Group). Nuc. Acids Res. 15:8451-8466.

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.

Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Lüthy, P. and Wolfersberger, M.G. (1986) *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K+ -gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Letters*, **204**, 213-218.

Sanders, P.; Winter, J.A.; Barnason, A.R.; Rogers, S.G. y Fraley, R.T. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35s and nopaline synthase promoters in transgenic plants. Nucleic Acids Res. 15:1543-1558.

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

Schlaman, H.R., Risseeuw, E., Franke-van Dijk, M.E. & Hooykaas, P.J. 1994. Nucleotide sequence corrections of the uidA open reading frame encoding beta-glucuronidase. Gene, vol. 138, pp. 259-260.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 775-806.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, y D.H. Dean. 1998. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

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

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.

Schuler, M.A., Schmitt, E.S. and Beachy, R.N. (1982) Closely related families of genes code for the alpha and alpha' subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nuc. Acid. Res.*, **10**, 8225-8244.

Schulz, A., A. Kruper, y N. Amrhein. 1985. Differential sensitivity of Bacterial 5-enopyruvylskikimate-3-Phosphate synthases to the herbicide glyphosate. FEMS microbiol. lett 28:297-301.

Schulz, M. and Weissenbock, G. (1987) Dynamics of the tissue-specific metabolism of luteolin glucuronides in the mesophyll of rye primary leaves (*Secale cereale*). *Z. Naturforsch.*, **43c**, 187-193.

Sims, S.R., Berberich, S.A., Nida, D.L., Segalini, L.L., Leach, J.N., Ebert, C.C. and Fuchs, R.L. (1996) Analysis of expressed proteins in fiber fractions from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. *Crop Science*, **36**, 1212-1216.

Smith, C.W., R.G. Cantrell, H.S. Moser, and S.R. Oakley. 1999. History of Cultivar Development in the United States. p. 99–171. *In* C.W. Smith and J. Cothren (ed.). Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley & Sons, New York.

Steinrücken, H. C. & Amrhein, N. 1980, "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase", Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 94, no. 4, pp. 1207-1212.

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

Tapp, H. and Stotzky, G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from Bacillus thuriengiensis subsp. kurstaki in soil. Soil Biol. Biochem. 30: 471-476.

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

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

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

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

US EPA. (1995) Plant pesticide *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in cotton; tolerance exemption; final rule. *U.S. Environmental Protection Agency; Fed. Reg.*, **60**, 47871.

US EPA. (1997) *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* Cry1A(c) and the genetic material necessary for its production in all plants; exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities; final rule. *U.S. Environmental Protection Agency Fed. Reg.*, **62**, 17720.

US EPA. (2004) *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab2; amended exemption from requirement of a tolerance. *Federal Register*, **69**, 16819-16823.

US EPA. (2006) *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab2 protein and the genetic material necessary for its production in corn in or on all corn commodities; temporary exemption from the requirement of a tolerance. *Federal Register*, **71**, 40431-40436.

USDA. (2002) Federal Seed Act regulations. *Agricultural Marketing Service*, **7 CFR Ch 201.74**, 370-377.

USDA. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Pesticide Fact Sheet.

Van den Broeck, G., Timko, M.P., Kausch, A.P., Cashmore, A.R., Van Montagu, M. and Herrera-Estrella, L. (1985) Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1.5 -bisphosphate carboxylase. *Nature*, **313**, 358-363.

Van Mellaert, H., Van Rie, J., Hofmann, C. and Reynaerts, A. (1988) Insectidical crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*: mode of action and expression in transgenic plants. *Conference on biotechnology, Biological pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management*

Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele, y H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins. Applied and environmental microbiology:1378-1385.

Venkateswerla, G. and G. Stotzky. 1992. Binding of the Protoxin and Toxin Proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on Clay Minerals. Current Microbiol. 25:225-233.

Wang, C., and Touster, O. 1972. Studies of Catalysis by beta-Glucuronidase. The Effect of Structure on the Rate of Hydrolysis of Substituted Phenyl-beta-D-Glucopyranosiduronic Acids , *J Biol Chem 247*, 2650.

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

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.

Wolfersberger, M.G., Hofmann, C. and P. Luthy. 1986. Interaction of Bacillus thuriengisis Delta-endotoxin with Membrane Vesicles Isolated from Lepidopteran Larval Midgut; In Bacterial Protein Toxin & Falmagne, P., Fehrenbech, F.J., Jeljaszewics, J. and Thelestam, M., eds. Gustav Fisher, NY pp. 237-238.

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

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

La semilla de algodón ***B2RF*** se sembrará en campos de agricultores participantes en la **Etapa Experimental** y las prácticas culturales y agronómicas se realizarán siguiendo las prácticas comerciales de producción de algodón y/o las guías técnicas para el cultivo del algodonero desarrolladas por investigadores del INIFAP en la región **(Tabla 5)**.

Para el ciclo **PV-2013** se tiene contemplado sembrar **25,000 hectáreas** de algodón ***B2RF*** en la región de **Tamaulipas Sur** a partir del mes de junio de 2013 **(Cuadro 2)**, para lo cual se solicita el mismo polígono aprobado durante el ciclo agrícola PV-2012 en **Etapa Experimental (Figura 15)**. Estaría la segunda liberación al ambiente para esta tecnología en la parte sur del Estado de Tamaulipas. Cabe mencionar que este polígono sólo aplica para este evento y esta región.

Cuadro 2. Cantidad de OGM (B2RF) a liberar en la región de Tamaulipas Sur.

REGIÓN PROPUESTA PARA EL PROGRAMA	CICLO	SUPERFICIE TOTAL DE LOS PREDIOS (Ha)	FECHA DE IMPORTACIÓN DE SEMILLA	PERIODO DE SIEMBRA	CANTIDAD DE SEMILLA REQUERIDA (kg)*
TAMAULIPAS SUR	PV - 2013	25,000	MAYO DE 2013	JUNIO DE 2013	359,375

*Densidad de siembra promedio: 14 kg/ha en Tamaulipas Sur.

Tabla 5. Prácticas agronómicas para el manejo del cultivo del algodón *B2RF* y convencional (Hernández-Jaso *et al*., 1996; Quiñónez-Pando *et al.,* 2000; Machain-Lillingston *et al*., 1988).

Prácticas agronómicas	Algodón B2RF	Convencional
Preparación del terreno		
Subsoleo	Inmediatamente después de la cosecha anterior	Inmediatamente después de la cosecha anterior
Barbecho	Inmediatamente después del subsoleo	Inmediatamente después del subsoleo
Rastreo	Inmediatamente después del barbecho	Inmediatamente después del barbecho
Nivelación	Después del barbecho	Después del barbecho
Época de siembra	1 de junio al 20 de julio	1 de junio al 20 de julio
Método de siembra	Siembra en húmedo o “a tierra venida”	Siembra en húmedo o “a tierra venida”
Densidad de siembra	14 Kg/ha	14 Kg/ha
Riegos	Cinco riegos de auxilio en las etapas fenológicas de: inicio de floración, máxima producción de botones florales, máxima producción de bellotas e inicio de capullos. Calendario de riego: a los 60, 80, 100 y 120 días; o bien a los 50, 70, 90, 110 y 130 días posteriores a la siembra	Cinco riegos de auxilio en las etapas fenológicas de: inicio de floración, máxima producción de botones florales, máxima producción de bellotas e inicio de capullos. Calendario de riego: a los 60, 80, 100 y 120 días; o bien a los 50, 70, 90, 110 y 130 días posteriores a la siembra
Fertilización	Al momento de la siembra e inmediatamente antes del primer riego de auxilio	Al momento de la siembra e inmediatamente antes del primer riego de auxilio
Labores de cultivo		
CONTROL DE MALEZA*	Control de maleza durante el periodo crítico de competencia durante los 30 a 75 días después de la emergencia del algodón **mediante la aplicación total postemergente del herbicida Faena Fuerte con Transorb® complementado con labores culturales.**	Control de maleza durante el periodo crítico de competencia durante los 30 a 75 días después de la emergencia del algodón mediante el uso herbicidas preemergentes residuales, herbicidas postemergentes y control mecánico y/o manual.
Control de plagas		
INSECTOS LEPIDÓPTEROS*	**Mediante la acción de la tecnología genética Bollgard®II (*B2*) integrada en la semilla de algodón**	Insecticidas
Otras plagas	Insecticidas	Insecticidas
Defoliación	Aplicar el defoliante cuando la planta tenga más del 50% de capullos	Aplicar el defoliante cuando la planta tenga más del 50% de capullos
Cosecha	Dos pizcas: la primera a los 25 días después de la aparición de los primeros capullos y la segunda 25 días después de la anterior.	Dos pizcas: la primera a los 25 días después de la aparición de los primeros capullos y la segunda 25 días después de la anterior.
Desvare	Inmediatamente después de la última pizca	Inmediatamente después de la última pizca

* Estas son las únicas prácticas que difieren en el manejo agronómico del algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® con relación al algodón convencional.

II.b. Ubicación del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

En la **Figura 15** se presenta un mapa que muestra el polígono de liberación en la región de **Tamaulipas Sur**. Este polígono abarca zonas agrícolas en los estados de Tamaulipas, Veracruz y San Luis Potosí.

La semilla de algodón ***B2RF*** se sembrará en campos de agricultores participantes en la **Etapa Experimental** y las prácticas culturales y agronómicas se realizarán siguiendo las prácticas comerciales de producción de algodón y/o las guías técnicas para el cultivo del algodonero desarrolladas por investigadores del INIFAP en las regiones **(Tabla 5).**

En la **Figura 16** se muestran los **Municipios** incluidos en el Polígono propuesto para la Etapa Experimental en la región de Tamaulipas Sur. En la **Figura 17** se muestran los Distritos de Desarrollo Rural comprendidos en el Polígono. En la Figura **18** se muestran las Zonas Agrícolas distribuidas en el Polígono y en la **Figura 19** se muestra que en el Polígono propuesto no se encuentran Áreas Naturales Protegidas. Se anexa la **Tabla 6** con las Coordenadas del Polígono de Tamaulipas Sur **(ANEXO 11. Tabla con Coordenadas del Polígono de Tamaulipas Sur PV-2013 Experimental).**

Para el ciclo **PV-2013** en **Etapa Experimental** se solicita una superficie potencial para siembra de **25,000 hectáreas (Cuadro 2, página 81)**, abarcando el polígono propuesto para la región de **Tamaulipas Sur**, donde iniciará la siembra de algodón a partir del mes de **junio de 2013**. Esto debido al compromiso de Monsanto por contribuir al crecimiento de la superficie algodonera nacional a un total de 400,000 hectáreas en los próximos años. Dicha meta se refiere al consenso alcanzado con el Consejo Nacional de Productores de Algodón, A. C. y el Comité Nacional Sistema Producto Algodón, A. C. con lo cual sería posible alcanzar la autosuficiencia de fibra de algodón en México durante los próximos 3 a 5 años.

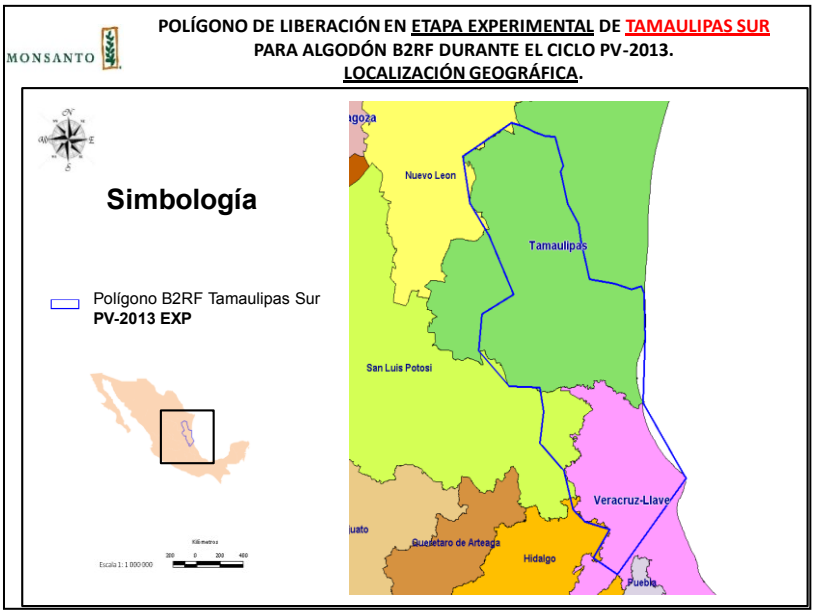


Figura 15. Localización geográfica del Polígono propuesto para la liberación de la tecnología *B2RF* en Tamaulipas Sur en Etapa Experimental durante el ciclo agrícola PV-2013.

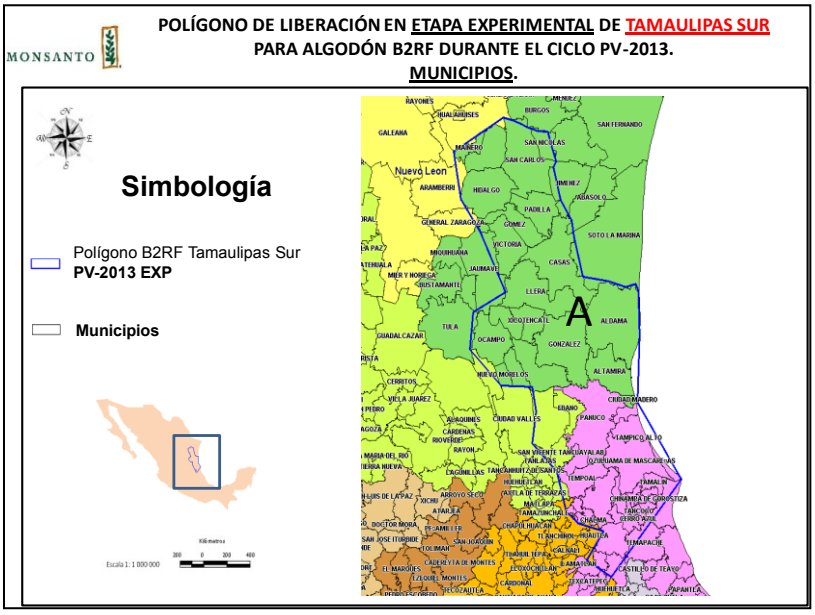


Figura 16. Municipios comprendidos por el Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013.

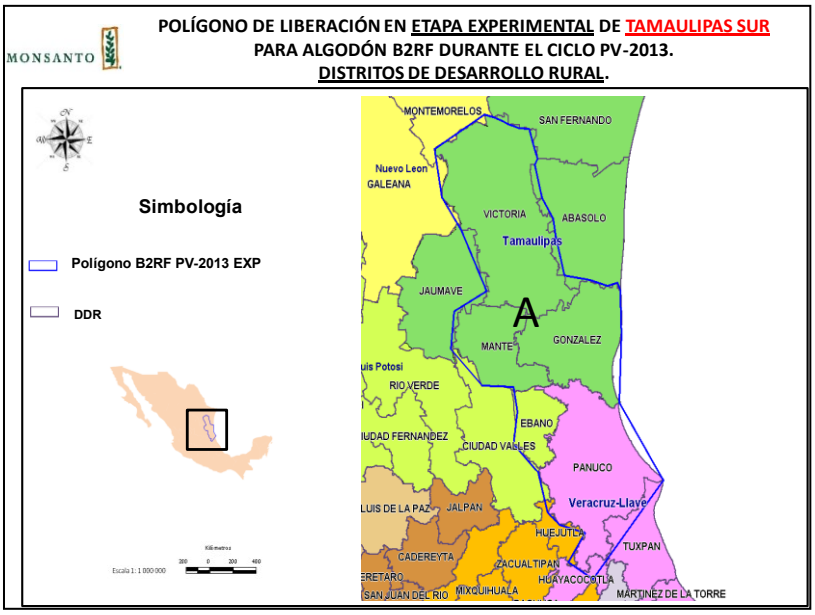


Figura 17. Distritos de Desarrollo Rural comprendidos por el Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013.

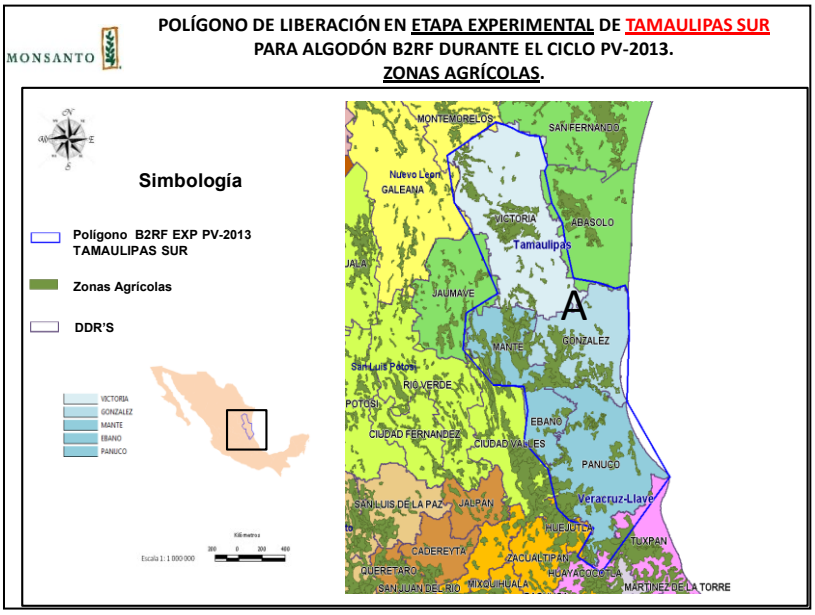


Figura 18. Zonas Agrícolas comprendidas por el Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013.

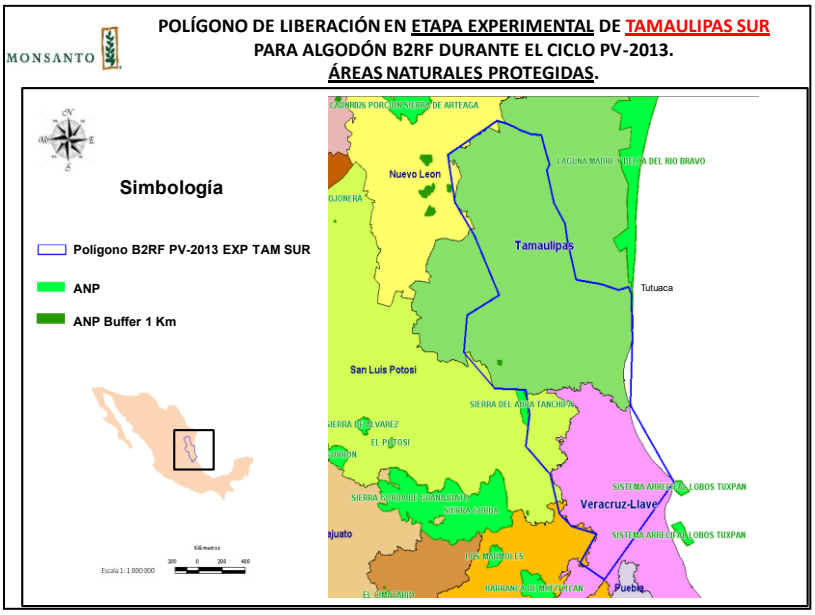


Figura 19. El Polígono de liberación durante la Etapa Experimental del algodón *B2RF*, correspondiente a Tamaulipas Sur, durante el ciclo agrícola PV-2013 no contiene Áreas Naturales Protegidas.

Tabla 6. Coordenadas UTM del polígono de Tamaulipas Sur PV-2013 Experimental.

Coordenadas del polígono de Tamaulipas Sur PV-2013 B2RF ETAPA EXPERIMENTAL				
Vértice	**Longitud (LL84)**	**Latitud (LL84)**	**Longitud X (UTM84-14N)**	**Latitud Y (UTM84-14N)**
1	-99.2082	24.8650	478965.4818	2750020.425
2	-99.1134	24.8404	488544.0466	2747283.276
3	-99.0342	24.8087	496544.0452	2743771.555
4	-98.9549	24.7771	504559.0555	2740268.435
5	-98.8987	24.7588	510237.2026	2738249.771
6	-98.8426	24.7406	515917.0148	2736233.437
7	-98.7379	24.7322	526503.6392	2735323.708
8	-98.6919	24.5794	531199.8081	2718409.376
9	-98.6469	24.4646	535787.5121	2705709.953
10	-98.6781	24.4103	532635.5728	2699693.895
11	-98.6010	24.1128	540551.5948	2666772.542
12	-98.4851	23.9213	552405.8996	2645606.567
13	-98.4578	23.7740	555239.7328	2629306.571
14	-98.3669	23.4101	564687.0876	2589057.452
15	-98.0942	23.3661	592574.1821	2584342.625
16	-97.9130	23.3149	611144.6304	2578799.588

Coordenadas del polígono de Tamaulipas Sur PV-2013 B2RF ETAPA EXPERIMENTAL				
Vértice	**Longitud (LL84)**	**Latitud (LL84)**	**Longitud X (UTM84-14N)**	**Latitud Y (UTM84-14N)**
17	-97.8081	23.3456	621844.1998	2582277.890
18	-97.7772	23.2750	625065.7307	2574487.022
19	-97.7702	22.9703	626070.2059	2540755.279
20	-97.7673	22.8945	626436.4995	2532366.733
21	-97.7895	22.2626	624728.3260	2462394.686
22	-97.3444	21.5879	671403.9135	2388129.543
23	-97.3221	21.5609	673741.8749	2385155.794
24	-98.0660	20.6647	597287.9657	2285323.955
25	-98.3264	20.8195	570096.4737	2302318.226
26	-98.1509	21.0855	588193.1510	2331845.117
27	-98.4113	21.1528	561120.3996	2339176.166
28	-98.5439	21.2646	547317.1625	2351498.629
29	-98.6430	21.6299	536949.1107	2391908.905
30	-98.9027	21.8822	510055.8511	2419787.700
31	-98.8635	22.1757	514071.5325	2452281.645
32	-98.9014	22.4048	510148.9070	2477633.228
33	-99.2324	22.4126	476085.2910	2478519.012
34	-99.5641	22.7460	442081.1507	2515515.564
35	-99.5251	23.0838	446219.8283	2552898.404
36	-99.1834	23.2690	481243.6267	2573315.574
37	-99.4500	23.8164	454161.9143	2633972.810
38	-99.6571	24.1180	433227.7218	2667446.960
39	-99.7330	24.5540	425769.3204	2715760.572

El **Polígono** propuesto para **Tamaulipas Sur** incluye áreas agrícolas en los municipios de **Abasolo, Aldama, Altamira, Casas, Cd. Madero, Gómez, González, Hidalgo, Jiménez, Llera, Mainero, Nuevo Morelos, Ocampo, Padilla, San Carlos, San Nicolás, Victoria y Xicoténcatl** en el **Estado de Tamaulipas; Cerro Azul, Chalma, Chinampa de Gorostiza, Ilamatlán, Ozuluama de Mascareñas, Pánuco, Tamalín, Tampico Alto, Tancoco y Temporal** en el **Estado de Veracruz;** y **Ébano, San Vicente Tancuayalab y Tamuín** en el **Estado de San Luis Potosí.**

Cabe mencionar que la tecnología ***B2RF*** se ha liberado en la parte norte del Estado de Tamaulipas (región Tamaulipas Norte) durante ciclos anteriores, incluyendo los ciclos PV-2011 y 2012 en Programa Piloto. Durante estos ciclos se ha generado información que forma el sustento científico de la funcionalidad de la tecnología y apoya la presente solicitud en Etapa Experimental.

II.c. Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas según características de diseminación

El polígono propuesto para la siembra de algodón ***B2RF*** en la región de Tamaulipas Sur se sustenta en la siguiente información:

- No incluye Áreas Naturales Protegidas establecidas oficialmente por la Comisión Nacional de Áreas Protegidas (CONANP) y decretadas en el Diario Oficial de la Federación.
- Con relación a los cuerpos de agua, los predios de algodón biotecnológico se ubicarán a una distancia no menor a un kilómetro de estos cuerpos de agua.
- En el polígono propuesto, la infraestructura disponible permite la siembra de algodón.

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

De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (http://www.ars-grin.gov), se reportan las siguientes especies de *Gossypium* para la región Norte de México **(Tabla 1, Página 15).**

En adición a la literatura consultada, se realizó una búsqueda sobre la presencia de especies del género *Gossypium* en el Estado de **Tamaulipas** en el sistema de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad **(REMIB)**[5]. Los resultados de la búsqueda indican dos reportes para la especie *Gossypium hirsutum* y no se encontraron registros de especies silvestres emparentadas en estas bases de datos:

Gossypium hirsutum. Colección: Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX); TEX 00074435; Fecha de colecta: 18-Septiembre-1981; colector(es): P. A. Fryxell & R. Magill; Localidad: Soto La Marina, Punta Esterillas, orilla Oeste de Laguna Morales, al Sur de La Pesca, cerca del nivel del mar; Sitio: Longitud: -97º 46' 30'', Latitud: 23º 41' 0''; Hábitat: parches entremezclados de salinas, pasto alto (*Spartina spartinae*) y montículos de matorrales espinosos con algo de manglar y pasto, cerca de la orilla del mar. Tipo de preparación: Herborizado (http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_distribucion.cgi).

[5] La Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) es un sistema computarizado de información biológica (incluye bases de datos de tipo curatorial, taxonómico, ecológico, cartográfico, bibliográfico, etnobiológico, de uso y catálogos sobre recursos naturales y otros temas), basado en una organización académica interinstitucional descentralizada e internacional formada por centros de investigación y de enseñanza superior, públicos y privados, que posean tanto colecciones biológicas científicas como bancos de información. La REMIB, es una red interinstitucional que comparte información biológica. Está constituida por nodos, formados por los centros de investigación que albergan las colecciones científicas.

Gossypium hirsutum. Colección: Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX); TEX 00074437; Fecha de colecta: 20-Febrero-1939; Colectores: H. LeSueur; Localidad: Soto La Marina, San José de los Leones; Sitio: Longitud: -97º 47' 26.02''; Latitud: 24º 16' 43''; Tipo de preparación: Herborizado (http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_distribucion.cgi).

Bases de datos consultadas:

- Herbario XAL del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-XAL).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-xal.html
- Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/encb-ipn.html
- Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/bangev-uach.html
- Herbario de la Universidad de Texas - Austin, EUA (LL, TEX).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ll-tex.html
- Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-Bajío).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-bajio.html
- Colección de Monocotiledóneas Mexicanas (UAM-I).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/uam-i.html
- Herbario del Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBIO).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/inbio.html
- Árboles y Arbustos Nativos para la Restauración Ecológica y Reforestación de México (IE-DF, UNAM).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-df-unam.html
- Herbario Sessé y Mociño: Plantas de la Real Expedición Botánica a Nueva España (1787 - 1803) (MA).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/sesse.html
- w3TROPICOS, Jardín Botánico de Missouri (MO). http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/missouri.html
- Herbario del CIBNOR.
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_cibnor.html
- Herbario Weberbauer de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL). http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/lamolina.html
- Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México (FES-I, UNAM).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_valle_tehuacan_cuicatlan.html
- Herbario de la Universidad de Arizona, EUA (ARIZ).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_universidad_arizona.html

- Herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, México (CICY).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/cicy_yucatan.html
- Agentes Bioactivos de Plantas Desérticas de Latinoamérica (ICBG).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ibunam_ibcg.html
- Herbario Kew del Real Jardín Botánico (RBGKEW).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/kew.html
- Ejemplares tipo de plantas vasculares del Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN).
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ejemplares_tipo_plantas_vasculares.html
- Estudio Florístico de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, México (ENCB, IPN).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_floristico_ipn.html
- Estudio monográfico del género *Echinopepon* Naud. (Cucurbitaceae) en México (ENCB, IPN).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_monografico_ipn.html
- La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de Las Salinas, Puebla, México (FES-I, UNAM).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_utildos_comunidades.html
- Herbario de Geo. B. Hinton, México.
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/hinton.html
- Colección de ejemplares tipo del Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX).
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/coleccion_ejemplares_herbario%20_tx.html
- Programa de repatriación de datos de ejemplares mexicanos.
- http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/jbny.html
  Colecciones de George Boole Hinton depositadas en el herbario de Kew: Familia Leguminosae.
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/rbgk.html

A lo largo de los ciclos de siembra autorizados en las regiones algodoneras del norte de México, se han realizado búsquedas y monitoreos de poblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum*, así como para verificar la presencia de la especie *Gossypium barbadense*. Estos estudios incluyeron las zonas de predios agrícolas y los alrededores de los sitios de liberación potencial. En ninguno de los estudios realizados se han encontrado poblaciones silvestres de especies de algodón. Esto debido a las prácticas culturales posteriores a la cosecha y a las disposiciones de Sanidad Vegetal conforme a la Norma Fitosanitaria 026, donde se estipula claramente que los agricultores deben destruir la vegetación residual de sus predios con la finalidad de evitar el establecimiento de insectos plaga. Además, existe un estudio exhaustivo sobre la presencia del género *Gossypium* en México y no se menciona a **Tamaulipas** como un Estado con presencia de especies de algodón silvestre (Palomo-Gil, 1996) **(ANEXO 12. ESTUDIO SOBRE PARIENTES SILVESTRES DE ALGODÓN EN MÉXICO).**

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 (Milton y Allen, 1995).

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 anfidiploide[6] (**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. El sureste de México y Guatemala son considerados como el **centro de origen y diversidad** de la especie *Gossypium hirsutum* L. Adicionalmente, 11 de las 13 especies silvestres diploides conocidas son endémicas de México. ***Éstas se encuentran distribuidas en la zona costera del Océano Pacífico y en los Estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Veracruz (Palomo, 1996).***

[6] Anfidiploide (alopoliploide): poliploide formado tras la unión de dos conjuntos de cromosomas distintos y su posterior duplicación.

Dado que en el área solicitada sólo se han reportado dos ocurrencias de la especie Gossypium hirsutum en áreas que claramente no son agrícolas, el potencial de cruzamiento con especies sexualmente compatibles es improbable. No se esperan consecuencias de los potenciales eventos de entrecruzamiento entre el algodón ***B2RF*** y algodones convencionales. Esto se debe al limitado movimiento del polen del algodón, la inocuidad de las proteínas conferidas y la carencia de ventaja selectiva que pudiera ser conferida a poblaciones ferales o especies relacionadas; si la polinización ocurriese el gen se encontraría en la semilla y en la planta receptora no se expresarían los genes introducidos.

Por otro lado, tomando en cuenta las medidas de bioseguridad señaladas en los incisos del punto **IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD** de esta solicitud y dadas las características fenotípicas, fenológicas y reproductivas del cultivo del algodón (que no se modifican en el algodón ***B2RF***), el cruzamiento de variedades tetraploides de ***B2RF*** con especies silvestres diploides resulta altamente improbable. Además, esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide.

En caso de presentarse polinización efectiva (el polen del algodón sólo es viable durante 24 horas y presenta poca capacidad de dispersión), las plantas híbridas triploides resultantes no podrían propagarse. Esto porque aunque usualmente crecen y desarrollan terminaciones florales, no forman polen viable debido a que los pares están desbalanceados y a la segregación de los cromosomas. Esto es de gran importancia porque en la evolución de las plantas, la ploidía se ha incrementado a partir de tales hibridaciones y se ha establecido que el *Gossypium* tetraploide (algodón cultivado) se originó de esta manera. Sin embargo, las observaciones empíricas indican que el proceso en este género es extremadamente raro y está ejemplificado por una sola ocurrencia.

Finalmente, todas las especies conocidas de *Gossypium* diferentes a las tetraploides poseen el mismo número de cromosomas (n=13). No se ha generado en la naturaleza otra ploidía en este género que haya sobrevivido hasta nuestros días. Esto es particularmente importante para México debido a que las especies tetraploides y diploides han coexistido por más de un millón de años (Wendel, 1989) y no se tienen registros de especies hexaploides, lo cual apoya la baja probabilidad de entrecruzamiento del algodón cultivado con sus parientes silvestres.

II.c.2. Descripción geográfica

Tamaulipas

Clima: El 58% del Estado de Tamaulipas presenta clima cálido subhúmedo, el 38% presenta clima seco y semiseco en el centro, el norte y hacia el suroeste del Estado; el 2% es templado subhúmedo en la región suroeste, y el restante 2% presenta clima cálido húmedo localizado hacia el suroeste.
Altitud: la región productiva de algodón en Tamaulipas Norte presenta alturas entre 1 y 75 MSNM.
Temperatura Media Anual: 23.5° C.
Temperatura Media Máxima Mensual: 22º C de junio a agosto.
Temperatura Media Mínima Mensual: 10º C en enero.
Precipitación Media Anual: 780 mm.

http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/tam/territorio/clima.aspx?tema=me&e=28
http://clima.inifap.gob.mx/redclima/clima/default.aspx?estado=27

Veracruz

Clima

Los climas que predominan en el estado son cálido subhúmedo 53.5% y cálido húmedo 41%, estos se localizan en la Llanura Costera del Golfo Norte y Sur; el 3.5% presenta clima templado húmedo, el cual se localiza en las partes altas de las zonas montañosas y el 1.5% presenta clima templado, localizado también en las partes altas de la montaña; el 0.5% es seco y semiseco localizado en la región oeste del estado; y finalmente, un pequeño porcentaje (0.05%) es clima muy frío y se encuentra en las partes altas del Pico de Orizaba y Cofre de Perote.

La temperatura media anual es de 23°C, la temperatura máxima promedio es de alrededor de 32°C y se presenta en los meses de abril y mayo; la temperatura mínima promedio es de 13°C y se presenta en el mes de enero.

La precipitación media estatal es de 1,500 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de junio a octubre; en la región colindante con Tabasco se presentan todo el año.

Relieve

La superficie estatal forma parte de las provincias: Sierra Madre Oriental, Llanura Costera del Golfo Norte, Eje Neovolcánico, Sierra Madre del Sur, Llanura Costera del Golfo Sur, Sierra de Chiapas y Guatemala y Cordillera Centroamericana.

En la costa norte se ha formado la laguna de Tamiahua a todo lo largo del estado predominan las llanuras, lomeríos y valles. Existen sierras formadas por rocas sedimentarias (se forman en las playas, los ríos y océanos y en donde se acumulen la arena y el barro), ígneas intrusivas (formadas debajo de la superficie de la Tierra), ígneas extrusivas o volcánicas (se forman cuando el magma o roca derretida sale de las profundidades hacia la superficie de la Tierra) y metamórficas (han sufrido cambios por la presión y las altas temperaturas), la elevación más alta la representa el volcán Pico de Orizaba o Citlaltépetl, con 5,610 metros sobre el nivel del mar (msnm) y la menor altitud se encuentra en la sierra La Garganta con 860 msnm.

La mayor extensión de playa conformada por dunas (montañas de arena) se encuentra en la ciudad de Veracruz con algunos kilómetros al norte y sur. El Lago de Catemaco se formó por la obstrucción de un flujo de lava.

http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ver/territorio/relieve.aspx?tema=me&e=30

San Luis Potosí

Clima

El clima que predomina es el seco y semiseco ya que se presenta en el 71% de la superficie del estado localizado en las región conocida como El Salado, el 15% está representado por el clima cálido subhúmedo, localizado en la parte este de la Sierra Madre Oriental, el 10% está representado por clima cálido húmedo, el cual se localiza hacia la Llanura Costera del Golfo, el 2.5% es clima muy seco localizado en la Mesa del Centro, el 1.5% es templado subhúmedo y se localiza en las llanuras que se encuentran entre las sierras, también se presenta clima templado húmedo en un porcentaje muy pequeño del 0.2 hacia el sureste del estado.

La temperatura media anual del estado es de 21°C, la temperatura mínima promedio es de **8.4°C** que se presenta en el mes de enero y la máxima promedio es alrededor de **32°C** se presenta en el mese de mayo. Las lluvias se presentan durante el verano en los meses de junio a septiembre, la precipitación media del estado es alrededor de **950 mm** anuales. La actividad agrícola se realiza principalmente en la zona de la huasteca, donde se presentan los climas cálidos húmedos y subhúmedos.

Relieve

La superficie estatal forma parte de las provincias: Llanura Costera del Golfo Norte, La Mesa del Centro y La Sierra Madre Oriental. Tiene varias altitudes, también tiene planicies y montañas en forma de escalón: el más bajo en la zona de la huasteca; el segundo la línea montañosa que forman las sierras del Rosal, Tapona, Venado o Moctezuma, Ahualulco y San Luis o San Miguelito; el siguiente peldaño lo forma una planicie entre las sierras de San Miguelito al oeste y la de Álvarez al este y en el extremo norte, el desierto de El Salado. Al

noreste de la ciudad de San Luis Potosí está ubicado un conjunto de sierras formadas por rocas sedimentarias y continentales.

La mayor elevación es Cerro Grande con una altitud de 3 180 metros sobre el nivel del mar (msnm), Sierra de Catorce con 3,110 msnm y la Sierra El Mastrante con 2,590 msnm. Casi la totalidad de área restante está integrada por bajadas que tienen altitudes aproximadas a 2,000 metros.

http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/slp/territorio/relieve.aspx?tema=me&e=24

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

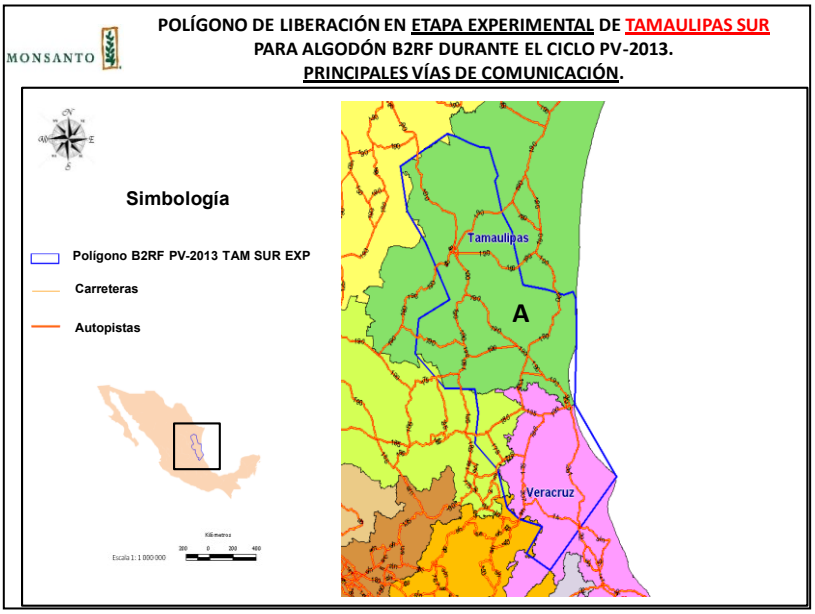


Figura 20. Principales vías de comunicación de la zona de liberación en el Polígono de la región de Tamaulipas Sur.

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

III.a. Estabilidad de la modificación genética del OGM

El evento ***B2RF*** se desarrolló por medio de la cruza tradicional de ***B2*** (MON-15985-7) y ***RF*** (MON-88913-8). No hay bases científicas que apoyen que las secuencias serían intrínsecamente más inestables cuando se combinan por técnicas de mejoramiento tradicional. La estabilidad de cada inserto en ***B2RF*** ha sido comprobada por métodos científicos estándares.

La estabilidad de los insertos, ***B2*** y ***RF***, en el evento apilado ***B2RF*** fue analizada después de generaciones múltiples. El análisis de hibridación Southern confirmó la presencia de los eventos individuales usando ADN extraído de la octava generación (BC_4F_4) de plantas de algodón ***B2RF***. El patrón de hibridación obtenido del evento apilado fue consistente con los reportados previamente para los eventos individuales, por lo que se concluyó que el evento apilado contiene ambos eventos individuales **(ANEXO 5. MSL-22368 Southern Blot confirma *B2* y *RF* en *B2RF*).**

La estabilidad genética de los eventos sencillos, ***B2*** y ***RF*** fue comprobada anteriormente. El análisis de hibridación Southern de las generaciones R5 y R6 del algodón ***BG*** (MON-531-6) (que fue transformando con Cry2Ab para desarrollar ***B2***) indicó un patrón de hibridación idéntico, lo que indica la estabilidad del inserto funcional del gen *cry1Ac* **(ANEXO 9. MSL-17469, Southern Blot Bollgard®)**.

Se analizaron las generaciones R1, R2, R3, R4 y BC_2F_3 de ***B2*** mediante hibridación Southern, dando lugar a un patrón de hibridación idéntico. Estos resultados prueban la estabilidad del inserto funcional del gen *cry2Ab2* **(ANEXO 10. MSL-16749, Análisis Molecular de Bollgard®II)**.

Se realizó un análisis de hibridación Southern a lo largo de cinco generaciones de algodón ***RF***. Durante los ensayos se comprobó que este evento contiene una sola copia del inserto en un solo locus de integración, el cual a su vez contiene dos copias intactas del gen *cp4 epsps* y no se encontraron secuencias adicionales del plásmido usado en la transformación. Además, se realizaron análisis de PCR y secuenciación para identificar los sitios de inserción y las regiones flanqueantes 5´ y 3´ del genoma del algodón, adyacentes a la construcción. Esto confirma la organización correcta de los elementos de la construcción y la estabilidad del evento en múltiples generaciones **(ANEXO 4. MSL-19580, Análisis Molecular de *RF*).**

Los datos de segregación para los eventos ***B2*** y ***RF*** son consistentes con los sitios de inserción individuales de cada inserto en el genoma del algodón y segregan mendelianamente. Se comprobó que los datos de segregación y estabilidad son consistentes con los análisis de hibridación Southern previos que demuestran la estabilidad de las secuencias insertadas de MON-15985-7 y MON-88913-8 en el evento ***B2RF.***

Los análisis de segregación demostraron patrones de herencia Mendeliana de las características de tolerancia a glifosato y de resistencia a insectos después de autopolinización o retrocruzamiento de los eventos ***B2*** y ***RF*** con otras variedades de algodón. La tolerancia al glifosato y la resistencia a insectos se han mantenido durante el desarrollo de estos eventos desde sus inicios a la fecha, al igual que la calidad de la semilla que se ha mantenido después de la transferencia de los eventos dentro de distintas variedades comerciales. De acuerdo con estos resultados, ***no existe evidencia de inestabilidad genética de los eventos de algodón B2 o RF.*** Estos datos confirman también que las construcciones genéticas que confieren las características ***B2*** y ***RF*** están integradas establemente en el genoma del algodón del evento apilado ***B2RF.***

Es poco probable que ocurra recombinación entre los insertos de ADN en el evento ***B2RF.*** Este hecho es apoyado por los estudios de estabilidad genética que muestran que se ha encontrado ADN modificado genéticamente heredado de ***B2*** y ***RF*** en el evento ***B2RF*** por varias generaciones sin diferencias en los patrones de bandas observados (análisis de hibridación Southern).

Si se llevara a cabo la recombinación, ésta afectaría secuencias genéticas localizadas en diferentes lugares del ADN genómico y, muy probablemente resultaría en translocaciones cromosomales con consecuencias letales o al menos disminución de la capacidad de supervivencia para las células afectadas y su progenie. Además, tales rearreglos tendrían que suceder en una fase temprana del desarrollo de la planta o la semilla para tener efectos significativos. Mientras más tarde ocurra, menor será el número de células vegetales afectadas. Dado que este tipo de recombinación es poco probable y tiene muchas posibilidades de producir líneas celulares no viables, es extremadamente poco probable que el producto recombinado origine alguna línea celular reproductiva.

En el caso altamente improbable en el cual ocurriera recombinación que involucrara los insertos en el evento ***B2RF***, este sería un proceso de translocación entre las secuencias que son homólogas entre los insertos de ***B2*** y ***RF***, limitadas al promotor 35S y la secuencia del péptido líder *ctp2*. La única consecuencia posible sería la modificación del nivel de expresión de los genes afectados y no una modificación de la calidad de la proteína producida. Incluso si este evento hipotético sucediera, afectaría sólo unas pocas semillas y, por lo tanto, la cantidad total de proteínas resultantes de este raro evento seguirían siendo extremadamente bajas y el nivel de exposición a dichas proteínas no cambiaría significativamente. Debido a la seguridad

demostrada de las proteínas recombinantes introducidas en ***B2RF***, el riesgo que podría surgir de esta recombinación hipotética es insignificante.

Conclusión

Tomando en cuenta la estabilidad de los elementos genéticos por varias generaciones, la segregación mendeliana también por varias generaciones, el bajísimo potencial de recombinación entre los insertos en el evento ***B2RF***, y la viabilidad e idoneidad seriamente comprometidas de las células afectadas por el evento hipotético de translocación genómica, el riesgo de tal recombinación es descartable. Varios años de cultivo comercial en varios países sin observaciones de inestabilidad genética proveen más evidencia en apoyo de este hecho. ***Se concluye que los insertos de ADN en el algodón B2RF se integraron de manera estable y las características conferidas son fenotípica y genéticamente estables a través de varias generaciones y condiciones ambientales.***

Ver carpetas de Caracterización Molecular y Secuencias nucleotídicas en el CD adjunto a este documento.

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

Se evaluaron los niveles de las proteínas CP4 EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII y GUS en tejido foliar y semillas colectadas de plantas ***B2RF*****,** y los eventos individuales y plantas convencionales producidas en cuatro localidades en Estados Unidos durante la temporada 2004 (Mozaffar *et al*., 2005). Las semillas son relevantes por su importancia en cuanto a seguridad de productos para alimento humano y animal. Los niveles proteicos se calcularon en base a métodos de ELISA desarrollados y validados para cuantificar cada proteína.

Niveles de la proteína CP4 EPSPS

Los niveles medios de proteína CP4 EPSPS en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 1700 y 1300 μg/g peso seco en tejido foliar y 310 y 330 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de CP4 EPSPS para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína Cry1Ac

Los niveles medios de proteína Cry1Ac en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 14 y 11 μg/g peso seco en tejido foliar y 1.8 y 1.8 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de Cry1Ac para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína Cry2Ab

Los niveles medios de proteína Cry2Ab en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 150 y 130 μg/g peso seco en tejido foliar y 270 y 230 μg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de Cry2Ab2 para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína NPTII

Sólo una de doce muestras de tejido foliar de ***B2RF*** y sólo una de diez muestras de tejido foliar del control en cuatro sitios muestreados mostraron niveles cuantificables de proteína NPTII (26 y 20 µg/g peso seco, respectivamente). Los niveles medios de proteína NPTII en semilla en cuatro sitios para *B2RF* y su control fueron 3.4 y 2.9 µg/g peso seco, respectivamente. Los niveles de NPTII para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Niveles de la proteína GUS

Los niveles medios de proteína GUS en cuatro sitios para ***B2RF*** fueron 1400 y 1100 µg/g peso seco en tejido foliar y 130 y 120 µg/g peso seco en semilla, respectivamente. Los niveles de GUS para los controles estuvieron por debajo del límite de detección como se esperaba.

Las muestras colectadas de plantas GM y controles sembradas en las pruebas de campo en Estados Unidos durante el 2004 fueron representativas de algodón comercial. Por lo tanto, los datos de niveles de proteínas son representativos de los niveles esperados en los cultivos de algodón comercial. Estos resultados confirman que la expresión de las cinco proteínas en tejidos de ***B2RF*** es comparable a la de los eventos individuales. Como se esperaba, la proteína AAD no se detectó en ninguna muestra, ya que este gen se encuentra bajo el control de un promotor bacteriano.

De acuerdo a los análisis de hibridación Southern del evento ***B2RF***, la estructura molecular de los insertos se ha conservado en el producto apilado, incluyendo los puntos de inserción. Los estudios realizados previamente sobre secuencias flanqueantes del inserto en el evento ***B2*** y en ***RF*** no revelaron riesgos en relación a posibles proteínas de fusión. Por lo tanto, no se espera la expresión de dichas proteínas en plantas con el evento ***B2RF*.**

Se realizaron análisis ELISA a semilla de los diferentes eventos con características de resistencia a lepidópteros obtenidas de ensayos en múltiples localidades en México en 2007. Se observaron niveles similares de las proteínas Cry1Ac para los eventos ***BG***, ***BGSF*** y ***B2RF*** entre las muestras de diferentes regiones. Además se obtuvieron niveles comparables de la proteína Cry2Ab en las muestras de semillas de ***B2RF*** entre las diferentes regiones **(ANEXO 6. RA 07-RA-60-2, Niveles de proteínas GM en hoja de algodón México 2007).** Estos

resultados concuerdan con los obtenidos en las pruebas de campo en Estados Unidos durante 1999 **(ANEXO 7. MSL-16614, Niveles de proteínas GM en algodón USA 1999)** y 2004 **(ANEXO 8. MSL-19892, Niveles de proteínas GM en algodón USA 2004)** donde se encontró que la expresión de las dos proteínas *Bt* (Cry1Ac y Cry2Ab) fue comparable entre regiones mediante detección inmunológica.

La eficacia insecticida se ha mantenido durante el desarrollo de los eventos de algodón biotecnológico, desde su comercialización en 1996 y seguida a partir de 2004 con ***B2***; al igual que la calidad de la semilla, que se ha mantenido después de la transferencia del gen *cry1Ac* y de la construcción con *cry1Ac* y *cry2Ab* dentro de distintas variedades comerciales.

III.c. Características del fenotipo del OGM

El algodón biotecnológico ***B2RF*** posee los genes *cry1ac* y *cry2Ab*, que le confieren resistencia a insectos lepidópteros y dos copias del gen *cp4 epsps*, que le confiere tolerancia la herbicida glifosato. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones génicas insertadas en ***B2RF*** no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

El evento de algodón ***B2RF*** no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional. Los datos que apoyan esta afirmación provienen de cientos de pruebas de campo llevadas a cabo desde 2002, en Australia, Argentina, Brasil, Colombia, India, México, Sudáfrica y Estados Unidos (incluyendo Puerto Rico), para probar sus características agronómicas, parámetros fenotípicos y eficacia. El evento ***B2RF*** se produjo cruzando algodón ***B2*** (MON-15985-7) con algodón ***RF*** (MON-88913-8) mediante métodos tradicionales de fitomejoramiento.

Por lo tanto es posible afirmar que, ***salvo por la resistencia a los insectos blanco (lepidópteros) y su tolerancia al herbicida glifosato, B2RF es fenotípicamente igual que los algodones convencionales tanto en México como en otras regiones del mundo.*** Los resultados de evaluaciones experimentales en las regiones algodoneras de México, donde se ha utilizado esta tecnología, son consistentes con lo observado en el resto del mundo. De esta manera, las características agregadas no impactan en su potencial como planta.

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

Salvo las características de resistencia a lepidópteros (genes *cry1Ac* y *cry2Ab*) y tolerancia al herbicida glifosato (gen *cp4 epsps*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón ***B2RF*****.** Este evento de algodón biotecnológico no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional.

Esta aseveración está soportada en cientos de pruebas de campo llevadas a cabo desde 2002 a la fecha, en Australia, Argentina, Brasil, Colombia, India, México, Sudáfrica y Estados Unidos (incluyendo Puerto Rico), para probar sus características agronómicas, parámetros fenotípicos y eficacia.

Por lo tanto es posible afirmar que, ***salvo por la resistencia a los insectos blanco (lepidópteros) y su tolerancia al herbicida glifosato, B2RF es fenotípicamente igual que los algodones convencionales tanto en México como en otras regiones del mundo.*** Los resultados de evaluaciones experimentales en las regiones algodoneras de México, donde se ha utilizado estas tecnologías por más de 10 años, son consistentes con lo observado en el resto del mundo. De esta manera, las características agregadas no impactan en su potencial como planta.

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

El evento de algodón ***B2RF*** no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional. Los datos que apoyan esta afirmación provienen de cientos de pruebas de campo llevadas a cabo desde 2002, en Australia, Argentina, Brasil, Colombia, India, México, Sudáfrica y Estados Unidos (incluyendo Puerto Rico), para probar sus características agronómicas, parámetros fenotípicos y eficacia. El evento ***B2RF*** se produjo cruzando ***B2*** con ***RF*** mediante métodos tradicionales de fitomejoramiento.

Las evaluaciones fenotípicas estadounidenses se basaron en los resultados de los eventos individuales que conforman el evento apilado. Esto es debido a la estabilidad genética, segregación normal y eficacia de los eventos individuales, confirmadas a través de varias generaciones. No encontraron diferencias fenotípicas (morfológicas) o fenológicas (desarrollo del cultivo, crecimiento y vigor) significativas, en numerosas pruebas de campo en México, en los eventos individuales ***B2*** y ***RF*** que se utilizaron para desarrollar ***B2RF***, asimismo el evento apilado tampoco presenta diferencias.

La evaluación fenotípica de las líneas parentales ***B2*** y ***RF*** incluyó el análisis de características agronómicas clave como germinación, vigor y desarrollo en condiciones de campo (ciclo de vida), rendimiento y calidad de la cosecha; la presencia del inserto de ADN, la producción de las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS, sus características fenotípicas y/o sus interacciones ecológicas. En estos estudios, el evento apilado se comparó con algodones convencionales que no contenía los insertos de ADN.

También se ha colectado información sobre la respuesta de la planta a la presencia de estresantes ambientales como plagas y enfermedades. Las interacciones ecológicas permiten concluir que los eventos ***B2*** y ***RF*** no confieren al algodón ningún incremento del potencial de plaga y tampoco se observaron cambios significativos en las interacciones del algodón con el medio ambiente. Esta caracterización fenotípica apoya la conclusión de que no hay cambios significativos presentes en ***B2RF***, más allá del evento deseado **(Ver carpeta de Estudios de Equivalencia Substancial y Reportes USDA).**

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

Los estudios sobre comportamiento agronómico, caracterización bioquímica, características fenotípicas y fenología del algodón biotecnológico ***B2RF***, realizados en las zonas algodoneras del norte de México desde 2004 a la fecha, demuestran que ninguno de los atributos reproductivos, capacidad de supervivencia o latencia se modifica como resultado de las características conferidas por la modificación genética. Esto debido a que las únicas características nuevas son la resistencia a lepidópteros y tolerancia a glifosato, producto de la inserción de las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS. En este sentido, las plantas de algodón ***B2RF*** no son diferentes de las plantas convencionales, que a su vez también son completamente dependientes del hombre y no pueden prosperar por sí mismas dadas sus limitaciones de dispersión de polen y semilla.

Por otro lado, las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. Así, la proteína CP4 EPSPS pertenece a la familia de las sintasas EPSPS, involucradas en la ruta bioquímica del shikimato para la producción de aminoácidos aromáticos en los cloroplastos de las plantas tolerantes al glifosato. Por otro lado, las proteínas Cry son proteínas insecticidas selectivas que actúan en el intestino de los insectos blanco (lepidópteros) e interactúan con receptores específicos, que no están presentes en las células epiteliales del intestino de humanos, peces, aves e insectos no blanco. Estas proteínas están localizadas en lugares diferentes en la célula, las proteínas CP4 EPSPS y Cry2Ab se localizan en los cloroplastos mientras que Cry1Ac en el citoplasma.

No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a glifosato otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas ***B2RF*** con el algodón convencional se ha ratificado durante varios años en ensayos de campo, y programas comerciales donde se han autorizado, lo que nos permite concluir que ***no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en los mencionados eventos como consecuencia de la modificación genética.***

Las características reproductivas no han sido alteradas en el evento apilado ***B2RF***, ni en los eventos individuales ***B2*** y ***RF***, a partir de los cuales se ha obtenido mediante cruzamiento convencional, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de apilamiento de las características introducidas mediante cruzamiento convencional, cuando se los compara con el algodón convencional.

Inocuidad de las proteínas introducidas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS

Cry1Ac y Cry2Ab

Los únicos productos de algodón utilizados para alimento humano son el aceite de semilla de algodón y las fibras de algodón procesadas (National Cottonseed Products Association, 1989). Los análisis de aceite refinado de semilla de algodón GM confirmaron que no hay proteína detectable en aceite de semilla de algodón, a un límite de detección para el ensayo de 1.3 ppm de proteína total. Esto es consistente con otros informes que concluyen sobre la ausencia de proteína en aceite de semilla de algodón (Cottonseed Oil, 1993). Los análisis de fibras procesadas también confirmaron que no había proteína detectable (Sims *et al.,* 1996). Por lo tanto, el consumo humano significativo de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab presentes en las variedades de algodón ***B2*** es extremadamente improbable. Además, pruebas directas con individuos alérgicos a proteínas contenidas en la harina derivada de cultivos oleaginosos (ej. soya, cacahuete y girasol) con el aceite de estos respectivos cultivos, han establecido que el aceite refinado no produce una respuesta alérgica (Bush *et al.,* 1985; Halsey *et al.,* 1986; Taylor *et al.,* 1981). Esto es consistente con la ausencia de proteína detectable en el aceite (Tattrie y Yaguchi, 1973). Esta información proporciona una base sólida para concluir que el aceite de semilla de algodón ***B2*** no causa preocupación significativa sobre alergenicidad, basándose en la falta de exposición significativa a proteínas.

La ausencia de un impacto medioambiental significativo de la familia de proteínas *Bt* ha sido demostrada a través del largo historial de uso seguro de productos microbianos de aplicación foliar. En todos los casos donde los efectos de las proteínas *Bt* han sido determinados en organismos no blanco, las concentraciones a las cuales se establece el nivel de efecto no observado (NOEL, por sus siglas en inglés) excedió por mucho la máxima concentración medioambiental de la proteína, indicando así un riesgo bajo a los organismos no blanco **(Ver Carpetas de Organismos No blanco).**

Se realizaron estudios para determinar si las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un riesgo para especies no blanco, incluyendo mamíferos, aves, peces, insectos y otros invertebrados terrestres. Estas proteínas fueron sometidas a evaluaciones de toxicidad usando los modelos animales de ratón (*Mus musculus*), codorniz (*Colinus virginianus*), bagre (*Ictalurus punctatus),* lombriz de tierra (*Eisenia fetida)* y en cinco especies de invertebrados terrestres benéficos que representan clases de insectos que pudieran estar expuestas a las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab del algodón biotecnológico: larvas y adultos de abejas (*Apis mellifera*), colémbolo (*Folsomia candida*), crisopa (*Chrysoperla carnea*), mariquita (*Hippodamia convergens*) y la avispa parásita (*Nasonia vitripennis*). Los resultados de estos estudios muestran que Cry1Ac y Cry2Ab2 presentan riesgo mínimo a estos insectos benéficos **(ANEXO 13. Resumen de solicitud Bollgard® US EPA; ANEXO 14. Resumen de solicitud Bollgard®II US EPA).**

Las consecuencias medioambientales de la introducción del evento de algodón ***B2RF*** han sido consideradas y no existe razón para creer que tenga un impacto negativo en organismos no blanco. Además, existe evidencia para pensar que este evento reducirá el impacto ambiental del cultivo del algodón mediante la reducción de aplicaciones de insecticidas sintéticos y del riesgo de desarrollo de resistencia en lepidópteros al *Bt*.

CP4 EPSPS

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizósfera de las plantas. Únicamente el gen *cp4 epsps* de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes al herbicida Faena Ultra®. 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 ***B2RF***, ya que el aceite derivado del algodón utilizado para el consumo humano no contiene esta proteína (Fuchs, 1994).

La proteína CP4 EPSPS no presenta homología con las secuencias de aminoácidos de las proteínas tóxicas y alergénicas de las bases de datos Pir Protein, Swissprot (Bairoch y Boeckmanm, 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 ***B2RF*** tolerantes al herbicida glifosato no presenta ningún riesgo de provocar reacciones alérgicas. El aceite de la semilla de algodón es el producto más utilizado para el consumo humano y los análisis del aceite derivado de variedades ***B2RF*** 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 Swissprot) y, por lo tanto, se concluye que la proteína CP4 EPSPS no presenta ningún potencial alergénico para los humanos. Adicionalmente, la proteína CP4 EPSPS es rápidamente desnaturalizada por el calor y la digestión enzimática y ácida en fluidos gástricos simulados (ANZFA, 2001b).

La proteína CP4 EPSPS purificada en dosis agudas de 572 mg/kg de peso corporal no produjo efectos adversos en ratones. Esta dosis representa más de 1000 veces el consumo potencial previsto de CP4 EPSPS en alimentos derivados de todos los cultivos GM que expresan esta enzima bajo desarrollo por Monsanto en ese tiempo (soya, papa, tomate, maíz) (Harrison *et al.,* 1996).

Las instituciones responsables de esta evaluación en los Estados Unidos (USDA-APHIS, FDA, EPA) y México (Secretaría de Salud) han dictaminado la inocuidad del algodón *B2RF* y aprobado su consumo humano y animal.

Potencial como maleza

El algodón (*Gossypium hirsutum* L.) ha sido caracterizado extensivamente y tiene una larga historia de producción agrícola segura. Las semillas son las únicas estructuras supervivientes y es poco probable que el algodón sobreviva como maleza debido a que esta especie ha sido el resultado de procesos de selección artificial dirigida **(ver el punto II, *Características fenotípicas*, en este reporte).**

La información colectada a través de estudios de campo en México y otros países, indica que el desempeño agronómico del evento ***B2RF*** es similar al de la línea parental convencional. A través de esta información se ha concluido que dicho evento no presenta ningún riesgo adicional de convertirse en maleza, con respecto al cultivo convencional **(Ver**

carpeta de Reportes USDA y el CD entregado junto con este documento con información relativa al "Estudio de los posibles riegos que la liberación de OGM´s pudieran causar a la Sanidad vegetal").

Baker (1965) desarrolló un consenso general respecto a los rasgos comunes de malezas: ciclo anual, alta producción de semillas, alto porcentaje de germinación y poca dormancia, varias generaciones por año, gran capacidad de dispersión y extrema susceptibilidad a un herbicida en particular. El algodón no posee estas características de maleza y se define tradicionalmente como un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984). Basados en la estructura floral de las plantas de algodón, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. Además, el polen del algodón sólo es viable durante 24 horas, lo cual presenta una barrera adicional a la reproducción y confirma el inexistente potencial de que el algodón se convierta en una maleza, ya que no cumple con las características de alta dispersión que poseen este tipo de plantas.

La falta de efectos no intencionales sobre la germinación y dormancia, factores predominantes que limitan el potencial de maleza, confirma que es improbable que el algodón ***B2RF*** se convierta en maleza. Por otro lado, las consecuencias agronómicas de las plantas voluntarias de algodón serían mínimas, ya que estas plantas se controlan fácilmente por medios mecánicos o por uno o varios herbicidas registrados para algodón.

Las consecuencias ambientales de la transferencia de polen de ***B2RF*** a otros algodones se consideran insignificantes debido a la limitada capacidad de movimiento del polen de algodón, la seguridad de las proteínas introducidas, y la falta de ventajas selectivas conferidas a la planta receptora. Sólo se esperaría transferencia de genes a otros algodones cultivados y en ese caso, en los niveles bajos, biológicamente normales para *Gossypium hirsutum*. Por lo tanto su capacidad de convertirse en maleza es nula.

El algodón ***B2RF*** es fenotípicamente igual que los algodones convencionales, tanto en México como en otras regiones del mundo. Los estudios sobre comportamiento agronómico, caracterización bioquímica y características fenotípicas y fenológicas realizadas en las regiones algodoneras del norte de México desde 2004 a la fecha, demuestran que ninguno de los atributos reproductivos, capacidad de supervivencia o latencia se modifica como resultado de las características conferidas por la modificación genética.

No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a glifosato otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas GM con el algodón convencional se ha ratificado durante varios años en ensayos de campo y programas comerciales donde se han autorizado, lo que nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en este evento como

consecuencia de la modificación genética **(Ver carpeta de Reportes USDA y el CD entregado junto con este documento con información relativa al "Estudio de los posibles riegos que la liberación de OGM´s pudieran causar a la Sanidad vegetal")**.

Debido a lo anterior, el algodón ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913*)*, ***no es considerado como una maleza y no representa un riesgo de convertirse en maleza más allá de lo que representarían los algodones convencionales****.*

Potencial de flujo génico

Aunque el cruzamiento natural es posible, el algodón es normalmente considerado un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984). Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. El polen se puede transferir por insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas mieleras.

Literatura reciente sobre algodón muestra que la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen. McGregor (1976) rastreó el movimiento de polen por medio de marcaje con partículas fluorescentes y encontró que, incluso entre flores localizadas a 150-200 pies de un campo de algodón rodeado de numerosas colonias de abejas para asegurar una buena oportunidad de transferencia de polen, las partículas se detectaron sólo en 1.6% de las flores.

Dadas las características fenotípicas, fenológicas y reproductivas del cultivo del algodón (que no se modifican en el algodón ***B2RF***), el cruzamiento de variedades tetraploides de ***B2RF*** con especies silvestres diploides resulta altamente improbable. Además, esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide.

En caso de presentarse polinización efectiva (el polen del algodón sólo es viable durante 24 horas y presenta poca capacidad de dispersión), las plantas híbridas triploides resultantes no podrían propagarse. Esto porque aunque usualmente crecen y desarrollan terminaciones florales, no forman polen viable debido a que los pares están desbalanceados y a la segregación de los cromosomas. Esto es de gran importancia porque en la evolución de las plantas, la ploidía se ha incrementado a partir de tales hibridaciones y se ha establecido que el *Gossypium* tetraploide (algodón cultivado) se originó de esta manera. Sin embargo, las observaciones empíricas indican que el proceso en este género es extremadamente raro y está ejemplificado por una sola ocurrencia.

Finalmente, todas las especies conocidas de *Gossypium* diferentes a las tetraploides poseen el mismo número de cromosomas (n=13). No se ha generado en la naturaleza otra ploidía en este género que haya sobrevivido hasta nuestros días. Esto es particularmente importante para México debido a que las especies tetraploides y diploides han coexistido por más de un millón de años (Wendel, 1989) y no se tienen registro de especies hexaploides, lo cual apoya la baja probabilidad de entrecruzamiento del algodón cultivado con sus parientes silvestres.

Las consecuencias ambientales de la transferencia de polen del evento ***B2RF*** a otros algodones es considerada despreciable debido a la limitada movilidad del polen del algodón, la inocuidad de las proteínas introducidas y la falta de cualquier ventaja selectiva conferida en la planta de algodón receptora. Se estima que el flujo génico interespecífico ocurra a niveles muy bajos, disminuyendo rápidamente a casi cero con el incremento de la distancia entre la fuente de polen y los receptores. En general, el potencial de entrecruzamiento con parientes silvestres es poco probable debido al relativo aislamiento de la distribución de especies del genero Gossypium, diferentes sistemas de cruzamiento e incompatibilidad genética.

El evento ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8) ***no exhibe ninguna característica fenotípica que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas***, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso remoto de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de la característica de tolerancia a glifosato a especies en hábitats no agrícolas no conferiría ventaja competitiva alguna, dado que la tecnología funciona como una protección ante estímulos externos como la presión de insectos y aplicaciones de glifosato, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional **(Ver Carpeta de Reportes USDA).**

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

A continuación se enlistan los métodos de detección para el algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®, los cuales se presentan en formato electrónico como parte de esta solicitud **(Ver Carpeta Métodos de detección)**.

Protocolos:

Monsanto Company. A recommended procedure for DNA extraction from plant tissues. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences **(ANEXO 15. Extracción de DNA).**

Monsanto Company. Recommended procedure for PEG precipitation of genomic plant DNA. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences **(ANEXO 16. Purificación de DNA)**.

Monsanto Company. A recommended procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Bollgard II® cotton, MON 15985. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences **(ANEXO 17. PCR *B2*)**.

Monsanto Company. A recommended procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for Roundup Ready® Flex cotton, MON 88913. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences **(ANEXO 18. PCR *RF*)**.

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

Potencial de flujo génico

Aunque el cruzamiento natural es posible, el algodón es normalmente considerado un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984). Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. El polen se puede transferir por insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas mieleras.

Literatura reciente sobre algodón muestra que la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen. McGregor (1976) rastreó el movimiento de polen por medio de marcaje con partículas fluorescentes y encontró que, incluso entre flores localizadas a 150-200 pies de un campo de algodón rodeado de numerosas colonias de abejas para asegurar una buena oportunidad de transferencia de polen, las partículas se detectaron sólo en 1.6% de las flores.

Dadas las características fenotípicas, fenológicas y reproductivas del cultivo del algodón (que no se modifican en el algodón ***B2RF***), el cruzamiento de variedades tetraploides de ***B2RF*** con especies silvestres diploides resulta altamente improbable. Además, esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide.

En caso de presentarse polinización efectiva (el polen del algodón sólo es viable durante 24 horas y presenta poca capacidad de dispersión), las plantas híbridas triploides resultantes no podrían propagarse. Esto porque aunque usualmente crecen y desarrollan terminaciones florales, no forman polen viable debido a que los pares están desbalanceados y a la segregación de los cromosomas. Esto es de gran importancia porque en la evolución de las plantas, la ploidía se ha incrementado a partir de tales hibridaciones y se ha establecido que el *Gossypium* tetraploide (algodón cultivado) se originó de esta manera. Sin embargo, las observaciones empíricas indican que el proceso en este género es extremadamente raro y está ejemplificado por una sola ocurrencia.

Finalmente, todas las especies conocidas de *Gossypium* diferentes a las tetraploides poseen el mismo número de cromosomas (n=13). No se ha generado en la naturaleza otra ploidía en este género que haya sobrevivido hasta nuestros días. Esto es particularmente importante para México debido a que las especies tetraploides y diploides han coexistido por más de un millón de años (Wendel, 1989) y no se tienen registro de especies hexaploides, lo cual apoya la baja probabilidad de entrecruzamiento del algodón cultivado con sus parientes silvestres.

Las consecuencias ambientales de la transferencia de polen del evento ***B2RF*** a otros algodones es considerada despreciable debido a la limitada movilidad del polen del algodón, la inocuidad de las proteínas introducidas y la falta de cualquier ventaja selectiva conferida en la planta de algodón receptora. Se estima que el flujo génico interespecífico ocurra a niveles muy bajos, disminuyendo rápidamente a casi cero con el incremento de la distancia entre la fuente de polen y los receptores. En general, el potencial de entrecruzamiento con parientes silvestres es poco probable debido al relativo aislamiento de la distribución de especies del genero *Gossypium*, diferentes sistemas de cruzamiento e incompatibilidad genética.

El evento ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8) no exhibe ninguna característica fenotípica que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso remoto de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de la característica de tolerancia a glifosato a especies en hábitats no agrícolas no conferiría ventaja competitiva alguna, dado que la tecnología funciona como una protección ante estímulos externos como la presión de insectos y aplicaciones de glifosato, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional **(Ver Carpeta de Reportes USDA).**

III.i. Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados

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.

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

Fuchs, R.L. 1994. Gene expression and compositional analysis from field-grown insect resistant cotton lines expressing full length *B.t.k.* HD-73 protein. Monsanto Technical Report, St. Louis, MO, USA.

Harrison, L., M. Bailey, M. Naylor, J. Ream, B.G. Hammond, D. Nida, y B. Burnette. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolypyryvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. Journal of Nutrition 126:728-740.

McGregor, S.E. 1976. Insect pollination of cultivated plants. Agriculture Handbook No. 496. USDA, Washington, DC. P. 171-190.

Mozzaffar, S., Bookout, J.T. and Bannon, G.A. (2005) Cry1Ac, Cry2Ab2, CP4 EPSPS, NPTII and GUS protein levels in cotton leaf and seed tissues from MON 88913 x MON 15985 produced in 2004 U.S. field trials. *Monsanto Technical Report*, **MSL 19892**

Naylor, M. W., (1993) Acute Oral Toxicity Study of CP4 EPSPS Protein in Albino Mice, Monsanto Technical Report, MSL-13077.

Niles, G.A. y Feaster, C.V. 1984. Cotton Agronomy No. 24, P. 205, Soil Science Society Of America, Inc. (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, Eds.), Wisconsin, USA

Sims, S.R., Berberich, S.A., Nida, D.L., Segalini, L.L., Leach, J.N., Ebert, C.C. and Fuchs, R.L. (1996) Analysis of expressed proteins in fiber fractions from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. *Crop Science*, **36**, 1212-1216.

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

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

IV.a. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad

Monsanto cuenta con un Protocolo de Bioseguridad, cuyo objetivo principal es el de proveer los lineamientos de las mejores prácticas y recomendaciones generales para el transporte, manejo, evaluación y disposición de materiales Genéticamente Modificados (GM); este documento se proporciona en esta solicitud y está a la disposición de los involucrados en las evaluaciones de algodón.

Durante todas las operaciones necesarias para el manejo de la tecnología ***B2RF*****,** tanto antes, durante y después de las actividades agrícolas, se aplicarán las Medidas de Bioseguridad descritas en el Protocolo de Bioseguridad para Organismos Genéticamente Modificados (OGM) **(ANEXO 19. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD GENERAL).**

La siembra de algodón ***B2RF*** se realizará únicamente en las zonas autorizadas por la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y no se sembrará algodón ***B2RF*** en las zonas pertenecientes a ninguna Área Natural Protegida.

Medidas de bioseguridad:

a) Se procederá a la localización georreferenciada de los lotes de los agricultores que siembren algodón ***B2RF*****.**

b) Se realizarán cursos de 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 ***B2RF*****.**

c) Se proporcionará la asistencia técnica necesaria a los agricultores para un adecuado manejo del cultivo.

d) Se notificará por escrito a la DGSV sobre cualquier situación durante el desarrollo del cultivo que pueda pudiera incrementar o disminuir los posibles riesgos para el ambiente, la diversidad biológica y/o la salud humana.

IV.a.1. Plan de monitoreo detallado

La siembra de algodón GM se realizará únicamente en las zonas autorizadas por los Permisos de Liberación al Ambiente, para efectos de los monitoreos propuestos a realizar:

- Se georreferenciarán las aduanas, almacenes y distribuidores, zonas autorizadas y lotes de los agricultores que siembren algodón GM.
- **Monitoreo de Plantas Voluntarias.** Después de la cosecha de predios sembrados con algodón GM, se inspección los predios y la zona aledaña a los predios cosechados en busca de plantas voluntarias. En el caso de detectarse la presencia de plantas voluntarias, se procede a su destrucción por métodos mecánicos o químicos con herbicidas distintos al glifosato.
- **Monitoreo de resistencia en insectos.** Un programa efectivo de manejo de resistencia en insectos es parte vital del uso responsable de productos de biotecnología para el control de insectos. Monsanto está comprometido a la implementación de un programa efectivo de manejo de resistencia en insectos para todos sus productos con tecnología *B.t.* en todos los países donde se comercializan, incluyendo la promoción del conocimiento de estos programas con los agricultores. Monsanto trabaja para el desarrollo y la implementación de programas de manejo de resistencia en insectos de una forma balanceada entre el conocimiento científico disponible, académicos y la implementación práctica, con la aceptación de los agricultores y la implementación del programa como componentes críticos. Desde las primeras introducciones en fase experimental de las tecnologías en México, MONSANTO consideró como alta prioridad establecer un programa de monitoreo y manejo de la resistencia a estas endotoxinas y desde 1997 ha apoyado investigación para el monitoreo de resistencia a la toxinas Cry, en los productos utilizados en México. Dicho programa de manejo de la resistencia se ha dividido en varias etapas: establecimiento de líneas base de susceptibilidad en especies objetivo, colectas de poblaciones en las diferentes regiones donde se siembran los productos para el control de insectos basados en dichas proteínas Cry y el monitoreo de la respuesta biológica a la toxina en bioensayos en laboratorio. En el programa participan los agricultores usuarios de las tecnologías Bollgard®, Bollgard®/Solución Faena® y Bollgard®II/Solución Faena Flex®, la compañía MONSANTO e instituciones de investigación agrícola como es el Colegio de Posgraduados (Dr. Concepción Rodríguez).
- **Monitoreo y prácticas del manejo de resistencia en malezas.** Monsanto está comprometido al uso apropiado y la efectividad de herbicidas a través de un programa de manejo responsable de productos y tecnologías consistente en cuatro partes principales: desarrollar recomendaciones apropiadas para el control de malezas, continuar la investigación para refinar y actualizar recomendaciones, educación de la importancia de las prácticas de buen manejo de malezas, y responder a consultas referentes al control de malezas a través de un programa de evaluación de desempeño

del producto. Las recomendaciones técnicas son comunicadas a los productores durante los programas de capacitación, a través de la Guía Técnica de Uso de los Productos y mediante de las licencias/contratos para el uso de las tecnologías y productos Monsanto. Los principales componentes del programa consisten en:

a. Monitorear los predios antes y después de la aplicación de herbicidas.
b. Comenzar con un predio limpio, mediante la aplicación de un herbicida o rastreo.
c. Controlar malezas en etapa temprana y cuando las malezas son pequeñas.
d. Usar el producto herbicida correcto a la dosis correcta y al tiempo óptimo para control eficiente.
e. Añadir otro herbicida (por ejemplo un selectivo y/o un residual) y prácticas culturales (por ejemplo barbecho o rotación de cultivos) como parte del sistema **Solución Faena Flex®** para el programa de control de malezas.
f. Incorporar otros herbicidas en un sistema continuo por medio de la rotación de cultivos.
g. Controlar escapes de maleza y evitar que la maleza genere semilla.
h. Limpiar el equipo antes de moverlo de un predio a otro para minimizar la diseminación de la semilla de maleza (así como nematodos, insectos y otras pestes del algodón).
i. Usar semilla comercial nueva, lo más limpia posible de semilla de maleza.

- Contactar al representante de Monsanto o al distribuidor local, si suceden problemas en el control de la maleza.
- Se anexa la Guía de Uso de Productos Monsanto que se entrega a los usuarios de la tecnología en las reuniones con el personal involucrado en la operación de los programas de algodón biotecnológico **(ANEXO 20. GUÍA TÉCNICA DE USO DE TECNOLOGÍAS MONSANTO).**

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

Con fundamento a toda la extensa documentación científica arbitrada sobre la posibles efectos en una gran variedad de organismos no blanco que han sido expuestos a las proteínas Cry *Bt* se ha demostrado que las proteínas *Bt* expresadas en estos productos no exhiben efectos ni producen cambios detectables a poblaciones de organismos no blanco expuestos a los niveles de proteínas *Bt* expresados en los tejidos vegetales de los cultivos GM **(Ver carpetas de Organismos No Blanco).**

A lo largo de los ciclos de siembra autorizados, se han realizado estudios de búsqueda de poblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum*, así como para verificar la presencia de la especie *Gossypium barbadense* en las regiones algodoneras del norte de México. Estos estudios incluyeron las zonas de predios agrícolas y los alrededores de los sitios de liberación potencial. En ninguno de los estudios realizados se han encontrado poblaciones silvestres de especies de algodón **(Ver la Carpeta Estudios de Parientes Silvestres México).**

Es muy escasa la probabilidad de que la cruza de las especies diploides produzca híbridos fértiles al cruzarse con variedades cultivadas tetraploides de *Gossypium hirsutum*. Además, no se esperan consecuencias de los potenciales eventos de entrecruzamiento entre el algodón ***B2RF*** y algodones convencionales. Esto se debe al limitado movimiento del polen del algodón, la inocuidad de las proteínas conferidas y la carencia de ventaja selectiva que pudiera ser conferida a poblaciones ferales o especies relacionadas; si la polinización ocurriese el gen se encontraría en la semilla y en la planta receptora no se expresarían los genes introducidos.

También se ofrecerá asesoría especializada a los productores y cursos de capacitación respecto del uso y manejo de las tecnologías de Monsanto. De esta manera se puede tener un mejor control de las posibles situaciones en campo.

Por otro lado, la producción algodonera se lleva a despepites para obtención de la fibra y las semillas se destinan a obtención de aceite y/o pasta empleada como suplemento alimenticio en nutrición animal. Además, como medida de bioseguridad, se realizan monitoreos de plantas voluntarias y se eliminan por métodos mecánicos o químicos, disminuyendo de esta manera la posibilidad de intercambio.

IV.a.3. Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona de la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación

Al final de cada periodo de cultivo, se inspeccionará la zona aledaña a los predios de algodonero en busca de plantas voluntarias. En el caso de detectarse la presencia de una planta voluntaria, se procederá a su destrucción mediante métodos mecánicos o químicos con herbicidas distintos al glifosato.

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

Transporte de la semilla

a) La semilla será movilizada por vía terrestre mediante camiones y para su manejo se seguirán las medidas de bioseguridad descritas en el punto 1 (Transporte y almacenamiento de material vegetal experimental modificado por ingeniería genética) del Protocolo de Bioseguridad para Organismos Genéticamente Modificados (OGM).

b) Las semillas de algodón ***B2RF*** 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.

c) Al documentar los embarques de semilla, se harán todas las especificaciones pertinentes a la compañía transportadora para que el material sea maniobrado con cuidado y evitar rompimiento, mutilación o daño físico de las bolsas. Los envases (bolsas) estarán claramente identificados mediante etiquetas visibles. Para mayor detalle ver el **ANEXO 19. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD GENERAL.**

d) Los envases (bolsas) estarán claramente identificados mediante etiquetas visibles.

Etiquetado de los envases

Todos los envases individuales estarán etiquetados con la siguiente información en idioma español:

- **Nombre comercial:** Algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.
- **Nombre del evento:** MON 15985 x MON 88913
- **Identificador único OECD:** MON-15985-7 x MON-88913-8.
- **Característica:** El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® (MON-15985-7 x MON-88913-8) se obtuvo mediante cruza convencional a partir de los eventos MON-15985-7 y MON-88913-8. El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contiene los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* que le confieren resistencia al ataque de insectos del 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), y dos copias del gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 que le confieren tolerancia al herbicida glifosato.
- **Tipo de material que se envía**: Semilla
- **Contenido neto:** Dependiendo del tamaño de la semilla, cada bolsa contiene 250,000 semillas con un peso que varia de 21 a 25 kg/bolsa.
- **Nombre, dirección y teléfono del proveedor de la semilla:**

Si se utiliza un envase secundario (embalaje) éste también se etiquetará de manera visible con la información del inciso anterior y especificará la cantidad de envases individuales que contiene.

Documentación para el transporte de la semilla de algodón B2RF.

a) Lista de inventario de todos los envases, embalajes y materiales que se envían especificando la fecha de envío.
b) Guía original de transporte especificando claramente la fecha de envío.
c) La guía de transporte y la lista de inventario debe enviarse vía fax o correo electrónico a la persona autorizada para recibir la semilla con anticipación al envío.
d) El exportador debe mantener copias de todos los documentos que acompañan el envío, incluyendo copia del permiso de importación y del certificado fitosanitario internacional.
e) Todos los documentos relacionados con el transporte de la semilla de algodón ***B2RF*** deben mantenerse bajo resguardo.

Recepción de los materiales transportados.

a) Verificación de la lista de inventario.
b) Los materiales deben mantenerse en un lugar seguro hasta que se confirme que la lista de inventario enviada coincide físicamente con los materiales recibidos.
c) Verificar el estado de los envases y confirmar que los sellos de seguridad no fueron abiertos.
d) En caso de que los envases hayan sido abiertos se debe comprobar que no se haya perdido el material, verificando el peso o cantidad de semilla enviada[7].

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 Monsanto sea notificada.
b) Notificar a todas las personas autorizadas y con capacidad de decisión con relación al algodón ***B2RF***.
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

[7] Cuando se trate de un OGM de importación se debe considerar que en las inspecciones que realiza la SAGARPA en las aduanas de entrada al país generalmente se toman muestras para análisis fitosanitario.

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.

Procedimiento para el almacenamiento de la semilla de algodón B2RF.

a) El área destinada para almacenar la semilla de algodón ***B2RF*** debe ser, identificada en forma clara.
b) El área destinada para el almacenamiento de la semilla debe ser limpiada exhaustivamente antes y después del periodo de almacenamiento.
c) Las entradas y salidas de material deben ser debidamente documentadas en el inventario del almacén.

De esta manera, se minimizan los riesgos de liberaciones no deseadas. En caso de ocurrir algún accidente o liberación no deseada, Monsanto se compromete a informar a la autoridad y a tomar las medidas correspondientes para mitigar dicha liberación.

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

Tomando en cuenta las medidas de bioseguridad señaladas en los incisos del punto **IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD** de esta solicitud, y dadas las características fenotípicas, fenológicas y reproductivas del cultivo del algodón (que no se modifican en el algodón ***B2RF***), el cruzamiento de variedades tetraploides de ***B2RF*** con especies silvestres diploides resulta altamente improbable. Aunque el cruzamiento natural es posible, el algodón es normalmente considerado un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984).

Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. El polen se puede transferir por insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas mieleras. Sin embargo, las especies silvestres del género *Gossypium* son diploides, mientras que las variedades cultivadas de *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* son

tetraploides. Esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide.

Literatura reciente sobre algodón muestra que la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen. McGregor (1976) rastreó el movimiento de polen por medio de marcaje con partículas fluorescentes y encontró que, incluso entre flores localizadas a 150-200 pies de un campo de algodón rodeado de numerosas colonias de abejas para asegurar una buena oportunidad de transferencia de polen, las partículas se detectaron sólo en 1.6% de las flores.

En caso de presentarse polinización efectiva (el polen del algodón sólo es viable durante 24 horas y presenta poca capacidad de dispersión), las plantas híbridas triploides resultantes no podrían propagarse. Esto porque aunque usualmente crecen y desarrollan terminaciones florales, no forman polen viable debido a que los pares están desbalanceados y a la segregación de los cromosomas. Esto es de gran importancia porque en la evolución de las plantas, la ploidía se ha incrementado a partir de tales hibridaciones y se ha establecido que el *Gossypium* tetraploide (algodón cultivado) se originó de esta manera. Sin embargo, las observaciones empíricas indican que el proceso en este género es extremadamente raro y está ejemplificado por una sola ocurrencia.

Todas las especies conocidas de *Gossypium* diferentes a las tetraploides poseen el mismo número de cromosomas (n=13). No se ha generado en la naturaleza otra ploidía en este género que haya sobrevivido hasta nuestros días. Esto es particularmente importante para México debido a que las especies tetraploides y diploides han coexistido por más de un millón de años (Wendel, 1989) y no se tienen registro de especies hexaploides, lo cual apoya la baja probabilidad de entrecruzamiento del algodón cultivado con sus parientes silvestres.

Las consecuencias ambientales de la transferencia de polen del evento ***B2RF*** a otros algodones son consideradas despreciables debido a la limitada movilidad del polen del algodón, la inocuidad de las proteínas introducidas y la falta de cualquier ventaja selectiva conferida en la planta de algodón receptora. Se estima que el flujo génico interespecífico ocurra a niveles muy bajos, disminuyendo rápidamente a casi cero con el incremento de la distancia entre la fuente de polen y los receptores. En general, el potencial de entrecruzamiento con parientes silvestres es poco probable debido al relativo aislamiento de la distribución de especies del genero *Gossypium*, diferentes sistemas de cruzamiento e incompatibilidad genética.

Finalmente, el evento ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8) no exhibe ninguna característica fenotípica que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso remoto caso de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de la característica de tolerancia a glifosato a especies en hábitats no agrícolas no conferiría ventaja

competitiva alguna, dado que la tecnología funciona como una protección ante estímulos externos como la presión de insectos y aplicaciones de glifosato, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional **(Ver Carpeta de Reportes USDA).**

No se permitirá el acceso a los predios donde se establezcan los estudios experimentales a ninguna persona que no esté debidamente acreditada por Monsanto.

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

La siembra de algodón ***B2RF*** se realizará únicamente en las zonas autorizadas por la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y no se sembrará algodón ***B2RF*** en las zonas pertenecientes a ninguna Área Natural Protegida.

Por otro lado, los agricultores cooperantes firman una ***Licencia*** **(ANEXO 21. Licencia agricultores)** para el uso de la tecnología genética de Monsanto. Al firmar, el agricultor se compromete a utilizar dicha tecnología de conformidad con los términos y condiciones establecidos en la **GUÍA TÉCNICA DE USO DE TECNOLOGÍAS MONSANTO (ANEXO 20)**.

Uno de los pilares del programa de seguimiento y manejo responsable de tecnologías (Stewardship) de Monsanto es el de proveer capacitación a todas las personas involucradas con el manejo organismos genéticamente modificados así como soporte técnico a los agricultores usuarios de cultivos biotecnológicos. Dichos entrenamientos y capacitaciones se llevan a cabo mediante presentaciones en reuniones con personal técnico de Monsanto, agentes aduanales, responsables de almacenes, distribuidores, despepites y agricultores y/o mediante la distribución de materiales impresos conocidos como **GUÍAS TÉCNICAS DE USO DE TECNOLOGÍAS MONSANTO (ANEXO 20)**.

Adicionalmente y como parte de un programa continuo se llevan a cabo cursos de capacitación a todo el personal involucrado en el proceso de producción sobre mejores prácticas agrícolas, responsabilidades regulatorias, beneficios y uso responsable del algodón biotecnológico. En cada evento se genera un registro de asistencia que funciona como evidencia y como memoria institucional.

Como parte de las actividades previas al ciclo de siembra de algodón PV-2013 en la región de **Tamaulipas Sur**, se llevarán a cabo una serie de eventos que nos permitirán asegurar que todos los involucrados en el manejo del algodón GM están al tanto del manejo correcto así como de sus responsabilidades para cumplir con los requisitos regulatorios.

Sin embargo, en caso de derrame accidental de semilla durante el transporte:

a) La empresa transportadora tendrá indicaciones para que se recoja la semilla derramada y mantengan el material bajo resguardo hasta que Monsanto sea notificada.
b) Notificar a todas las personas autorizadas y con capacidad de decisión con relación al algodón ***B2RF***.
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.

Monsanto cuenta con un **PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD**, cuyo objetivo principal es el de proveer los lineamientos de las mejores prácticas y recomendaciones generales para el transporte, manejo, evaluación y disposición de materiales Genéticamente Modificados (GM); este documento se proporciona en esta solicitud y está a la disposición de los involucrados en las evaluaciones de algodón.

Durante todas las operaciones necesarias para el manejo de la tecnología ***B2RF***, tanto antes, durante y después de las actividades agrícolas, se aplicarán las medidas de bioseguridad descritas en el Protocolo de Bioseguridad para Organismos Genéticamente Modificados (OGM) **(ANEXO 19. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD GENERAL).**

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

La semilla de algodón ***B2RF*** se sembrará en campos de agricultores participantes en la Etapa Experimental y las prácticas culturales y agronómicas se realizarán siguiendo las prácticas comerciales de producción de algodón y/o las guías técnicas para el cultivo del algodonero desarrolladas por investigadores del INIFAP en la región **(Tabla 5)**. Además el transporte desde las aduanas hasta el productor se realizará en estricto apego a los lineamientos del **PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD GENERAL (ANEXO 19)**.

Por otro lado, la producción algodonera (GM y convencional, sin distinción) se lleva a despepites para obtención de la fibra y las semillas se destinan a obtención de aceite y/o pasta empleada como suplemento alimenticio en nutrición animal. Además, como medida de bioseguridad, se realizan **monitoreos de plantas voluntarias** y se eliminan por métodos mecánicos o químicos, disminuyendo de esta manera la posibilidad de intercambio. Por lo tanto, juzgamos que no es necesario aislar los predios, ya que la tecnología ha demostrado su

seguridad en estudios de laboratorio y en los programas agronómicos conducidos en las regiones algodoneras de México y el mundo.

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

La semilla de algodón ***B2RF*** se sembrará en campos de agricultores participantes en el programa experimental y las prácticas culturales y agronómicas se realizarán siguiendo las prácticas comerciales de producción de algodón y/o las guías técnicas para el cultivo del algodonero desarrolladas por investigadores del INIFAP en la región **(Tabla 5).** Además el transporte desde las aduanas hasta el productor se realizará en estricto apego a los lineamientos del **PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD GENERAL (ANEXO 19).**

Por otro lado, las líneas de algodón ***B2RF*** han sido modificadas genéticamente para expresar las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* y CP4 EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4. Estas proteínas les confieren resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosato, respectivamente. Antes de introducir las variedades de algodón ***B2RF*** al mercado se han estudiado exhaustivamente en relación a su inocuidad para el consumo humano y animal. Las instituciones responsables de esta evaluación en los Estados Unidos (USDA-APHIS, FDA, EPA) y México (Secretaría de Salud) han dictaminado la inocuidad del algodón ***B2RF*** y aprobado su consumo humano y animal.

En estos países, Monsanto ha presentado las evidencias científicas que demuestran que los productos derivados del algodón ***B2RF*** son sustancialmente equivalentes en composición, propiedades funcionales, nutricionales y de seguridad en relación a los derivados de las variedades de algodón convencionales y difieren únicamente en su resistencia a insectos lepidópteros y su capacidad de tolerar la acción del herbicida glifosato. Asimismo, Monsanto (el promovente) cuenta con autorización por parte de la Secretaria de Salud para comercializar la semilla de algodón ***B2RF*** para su procesamiento industrial y para consumo humano y/o alimentación de ganado **(ANEXO 22. Permiso de Secretaría de Salud para *B2RF*)**.

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

a) Cosecha del algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® (*B2RF*).

El algodón ***B2RF*** será cosechado como tradicionalmente se ha hecho por productores de algodón, ya que se ha demostrado que no existen diferencias en componentes agronómicos y calidad entre el algodón ***B2RF*** y convencional. Monsanto cuenta con autorización por parte de la Secretaria de Salud para comercializar la semilla de algodón ***B2RF*** para su procesamiento industrial y/o alimentación de ganado.

Las líneas de algodón ***B2RF*** han sido modificadas genéticamente para expresar las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS de las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Agrobacterium sp.* cepa CP4, respectivamente, lo cual les confiere resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida FAENA FUERTE CON TRANSORB®. Antes de introducir las variedades de algodón ***B2RF*** al mercado se han estudiado exhaustivamente en relación a su inocuidad para el consumo humano y animal. Las instituciones responsables de esta evaluación en los Estados Unidos (USDA-APHIS, FDA, EPA) y México (Secretaría de Salud) han dictaminado la inocuidad del algodón ***B2RF*** y aprobado su consumo humano y animal. En estos países, Monsanto ha presentado las evidencias científicas que demuestran que las variedades de algodón ***B2RF*** son substancialmente equivalentes en composición, propiedades funcionales, nutricionales y de seguridad en relación a los derivados de las variedades de algodón convencionales y difieren únicamente en su resistencia a insectos lepidópteros y su capacidad de tolerar la acción del herbicida Faena Fuerte con Transorb®.

b) Manejo de cosecha.

Las empresas despepitadoras firmarán un convenio en los mismos términos que los agricultores para que la semilla de algodón ***B2RF*** cosechada no sea enajenada a terceros y se destine a su procesamiento industrial o alimentación de ganado. Despepites autorizados en la región de **Tamaulipas (Cuadro 3)**:

Cuadro 3. Despepites autorizados para la región de Tamaulipas Sur.

Región	Despepite	Dirección	Latitud	Longitud
Tamaulipas	Unión de Algodoneros las Yescas	Carretera 120, km 92, Ejido Álvaro obregón, Valle Hermoso, Tamaulipas. C.P. 87500	25.57267	-97.81892

c) La industrialización de la semilla de algodón.

Cuando el algodón llega a la planta beneficiadora, ésta 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 rama, que es depositado en bodegas, luego, éste a través de tuberías llega a la desmotadoras, 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 rama en algodón oro, es aproximadamente de 113.63 - 119.54 kg de algodón rama para 45.45 kg de algodón oro.

La semilla está recubierta por una vellosidad llamada linter, la semilla con linter es vendida para consumo animal, cuando es separado el linter de la almendra el linter es utilizado para la elaboración de colchones, almohada, etc., y de la almendra se extrae el aceite comestible, obteniendo también como resultado, la torta de semilla de algodón.

Otro de los aprovechamientos de la planta del algodón, es la extracción de aceite de la semilla. Dentro de cada capullo de algodón se localizan de seis a diez semillas, cuyo peso es de alrededor de las dos terceras partes del peso total del capullo. Los productos obtenidos en promedio durante el proceso de extracción de aceite son: aceite 16.5%, pasta o harinolina 45.5%, cascarilla 25%, borra 8% y materia desechable 5%.

d) Manejo de los restos del cultivo.

Los restos de las plantas de algodón son eliminados después de la cosecha mediante una práctica cultural conocida como desvare, en el marco de las acciones de la campaña contra plagas del algodonero coordinadas por la SAGARPA. Esta práctica tiene como objetivo eliminar posibles larvas invernantes de gusano rosado y adultos de picudo del algodón presentes en los restos de las plantas de algodón. La práctica de desvare es obligatoria para todos los agricultores.

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 evento de algodón ***B2RF*** se ha liberado y se han realizado cientos de ensayos de campo llevadas a cabo desde 2002 a la fecha, en Australia, Argentina, Brasil, Colombia, India, Sudáfrica, Estados Unidos (incluyendo Puerto Rico) y México, para probar sus características agronómicas, parámetros fenotípicos y eficacia. El evento ***B2RF*** se produjo cruzando algodón ***B2*** (MON-15985-7) con algodón ***RF*** (MON-88913-8) mediante métodos tradicionales de fitomejoramiento (http://cera-gmc.org/).

El algodón biotecnológico ***B2RF*** ha sido liberado en las regiones algodoneras del norte de México durante varios ciclos agrícolas durante los cuales ha demostrado buenos rendimientos a través de la protección contra insectos y el uso del glifosato como herbicida total para el control de las malezas que le compiten al algodón por recursos.

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

Los estudios sobre comportamiento agronómico, caracterización bioquímica y características fenotípicas y fenológicas del algodón biotecnológico ***B2RF***, realizados en las zonas algodoneras del norte de México desde 2004 a la fecha, demuestran que ninguno de los atributos reproductivos, capacidad de supervivencia o latencia se modifica como resultado de las características conferidas por la modificación genética. Esto debido a que las únicas características nuevas son la resistencia a lepidópteros y tolerancia a glifosato, producto de la inserción de las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS. En este sentido, las plantas de algodón ***B2RF*** no son diferentes de las plantas convencionales, que a su vez también son completamente dependientes del hombre y no pueden prosperar por sí mismas dadas sus limitaciones de dispersión de polen y semilla.

Por otro lado, las proteínas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. Así, la proteína CP4 EPSPS pertenece a la familia de las sintasas EPSPS, involucradas en la ruta bioquímica del shikimato para la producción de aminoácidos aromáticos en los cloroplastos de las plantas tolerantes al glifosato. Por otro lado, las proteínas Cry son proteínas insecticidas selectivas que actúan en el intestino de los insectos blanco (lepidópteros) e interactúan con receptores específicos, que no están presentes en las células epiteliales del intestino de humanos, peces, aves e insectos no blanco. Estas proteínas están localizadas en lugares diferentes en la célula, las proteínas CP4 EPSPS y Cry2Ab se localizan en los cloroplastos mientras que Cry1Ac en el citoplasma.

No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a glifosato otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas ***B2RF*** con el algodón convencional se ha ratificado durante varios años en ensayos de campo, y programas comerciales donde se han autorizado, lo que nos permite concluir que ***no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en los mencionados eventos como consecuencia de la modificación genética (*Ver carpeta de Reportes USDA y el CD entregado junto con este documento con información relativa al "Estudio de los posibles riegos que la liberación de OGM´s pudieran causar a la Sanidad vegetal").**

Las características reproductivas no han sido alteradas en el evento apilado ***B2RF***, ni en los eventos individuales ***B2*** y ***RF***, a partir de los cuales se ha obtenido mediante cruzamiento convencional, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de apilamiento de las características introducidas mediante cruzamiento convencional, cuando se los compara con el algodón convencional.

Inocuidad de las proteínas introducidas Cry1Ac, Cry2Ab y CP4 EPSPS

Cry1Ac y Cry2Ab

Los únicos productos de algodón utilizados para alimento humano son el aceite de semilla de algodón y las fibras de algodón procesadas (National Cottonseed Products Association, 1989). Los análisis de aceite refinado de semilla de algodón GM confirmaron que no hay proteína detectable en aceite de semilla de algodón, a un límite de detección para el ensayo de 1.3 ppm de proteína total. Esto es consistente con otros informes que concluyen sobre la ausencia de proteína en aceite de semilla de algodón (Cottonseed Oil, 1993). Los análisis de fibras procesadas también confirmaron que no había proteína detectable (Sims *et al.,* 1996). Por lo tanto, el consumo humano significativo de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab presentes en las variedades de algodón ***B2*** es extremadamente improbable. Además, pruebas directas con individuos alérgicos a proteínas contenidas en la harina derivada de cultivos oleaginosos (ej. soya, cacahuete y girasol) con el aceite de estos respectivos cultivos, han establecido que el aceite refinado no produce una respuesta alérgica (Bush *et al.,* 1985; Halsey *et al.,* 1986; Taylor *et al.,* 1981). Esto es consistente con la ausencia de proteína detectable en el aceite (Tattrie y Yaguchi, 1973). Esta información proporciona una base sólida para concluir que el aceite de semilla de algodón ***B2*** no causa preocupación significativa sobre alergenicidad, basándose en la falta de exposición significativa a proteínas.

La ausencia de un impacto medioambiental significativo de la familia de proteínas *Bt* ha sido demostrada a través del largo historial de uso seguro de productos microbianos de aplicación foliar. En todos los casos donde los efectos de las proteínas *Bt* han sido determinados en organismos no blanco, las concentraciones a las cuales se establece el nivel de efecto no observado (NOEL, por sus siglas en inglés) excedió por mucho la máxima concentración medioambiental de la proteína, indicando así un riesgo bajo a los organismos no blanco **(Ver Carpetas de Organismos No blanco).**

Se realizaron estudios para determinar si las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab presentan un riesgo para especies no blanco, incluyendo mamíferos, aves, peces, insectos y otros invertebrados terrestres. Estas proteínas fueron sometidas a evaluaciones de toxicidad usando los modelos animales de ratón (*Mus musculus*), codorniz (*Colinus virginianus*), bagre (*Ictalurus punctatus),* lombriz de tierra (*Eisenia fetida)* y en cinco especies de invertebrados terrestres benéficos que representan clases de insectos que pudieran estar expuestas a las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab del algodón biotecnológico: larvas y adultos de abejas (*Apis mellifera*), colémbolo (*Folsomia candida*), crisopa (*Chrysoperla carnea*), mariquita (*Hippodamia convergens*) y la avispa parásita (*Nasonia vitripennis*). Los resultados de estos estudios muestran que Cry1Ac y Cry2Ab2 presentan riesgo mínimo a estos insectos benéficos **(ANEXO 13. Resumen de solicitud Bollgard® US EPA; ANEXO 14. Resumen de solicitud Bollgard®II US EPA).**

Las consecuencias medioambientales de la introducción del evento de algodón ***B2RF*** han sido consideradas y no existe razón para creer que tenga un impacto negativo en organismos no blanco. Además, existe evidencia para pensar que este evento reducirá el impacto ambiental del cultivo del algodón mediante la reducción de aplicaciones de insecticidas sintéticos y del riesgo de desarrollo de resistencia en lepidópteros al *Bt*.

CP4 EPSPS

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizósfera de las plantas. Únicamente el gen *cp4 epsps* de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes al herbicida Faena Ultra®. 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 expuesto a la proteína CP4 EPSPS expresada por el algodón ***B2RF***, ya que el aceite derivado del algodón utilizado para el consumo humano no contiene esta proteína (Fuchs, 1994).

La proteína CP4 EPSPS no presenta homología con las secuencias de aminoácidos de las proteínas tóxicas y alergénicas de las bases de datos Pir Protein, Swissprot (Bairoch y Boeckmanm, 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 ***B2RF*** tolerantes al herbicida glifosato no presenta ningún riesgo de provocar reacciones alérgicas. El aceite de la semilla de algodón es el producto más utilizado para el consumo humano y los análisis del aceite derivado de variedades ***B2RF*** 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 Swissprot) y, por lo tanto, se concluye que la proteína CP4 EPSPS no presenta ningún potencial alergénico para los humanos. Adicionalmente, la proteína CP4 EPSPS es rápidamente desnaturalizada por el calor y la digestión enzimática y ácida en fluidos gástricos simulados (ANZFA, 2001b).

La proteína CP4 EPSPS purificada en dosis agudas de 572 mg/kg de peso corporal no produjo efectos adversos en ratones. Esta dosis representa más de 1000 veces el consumo potencial previsto de CP4 EPSPS en alimentos derivados de todos los cultivos GM que expresan esta enzima bajo desarrollo por Monsanto en ese tiempo (soya, papa, tomate, maíz) (Harrison *et al.,* 1996).

Las instituciones responsables de esta evaluación en los Estados Unidos (USDA-APHIS, FDA, EPA) y México (Secretaría de Salud) han dictaminado la inocuidad del algodón ***B2RF*** y aprobado su consumo humano y animal.

Potencial como maleza

El algodón (*Gossypium hirsutum* L.) ha sido caracterizado extensivamente y tiene una larga historia de producción agrícola segura. Las semillas son las únicas estructuras supervivientes y es poco probable que el algodón sobreviva como maleza debido a que esta especie ha sido el resultado de procesos de selección artificial dirigida **(ver el punto II, *Características fenotípicas*, en este reporte).**

La información colectada a través de estudios de campo en México y otros países, indica que el desempeño agronómico del evento ***B2RF*** es similar al de la línea parental convencional. A través de esta información se ha concluido que dicho evento no presenta ningún riesgo adicional de convertirse en maleza, con respecto al cultivo convencional **(Ver carpeta de Reportes USDA).**

Baker (1965) desarrolló un consenso general respecto a los rasgos comunes de malezas: ciclo anual, alta producción de semillas, alto porcentaje de germinación y poca dormancia, varias generaciones por año, gran capacidad de dispersión y extrema susceptibilidad a un herbicida en particular. El algodón no posee estas características de maleza y se define tradicionalmente como un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984). Basados en la estructura floral de las plantas de algodón, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. Además, el polen del algodón sólo es viable durante 24 horas, lo cual presenta una barrera adicional a la reproducción y confirma el inexistente potencial de que el algodón se convierta en una maleza, ya que no cumple con las características de alta dispersión que poseen este tipo de plantas.

La falta de efectos no intencionales sobre la germinación y dormancia, factores predominantes que limitan el potencial de maleza, confirma que es improbable que ***B2RF*** se convierta en maleza. Por otro lado, las consecuencias agronómicas de las plantas voluntarias de algodón serían mínimas, ya que estas plantas se controlan fácilmente por medios mecánicos o por uno o varios herbicidas registrados para algodón.

Las consecuencias ambientales de la transferencia de polen de ***B2RF*** a otros algodones se consideran insignificantes debido a la limitada capacidad de movimiento del polen de algodón, la seguridad de las proteínas introducidas, y la falta de ventajas selectivas conferidas a la planta receptora. Sólo se esperaría transferencia de genes a otros algodones cultivados y en ese caso, en los niveles bajos, biológicamente normales para *Gossypium hirsutum*. Por lo tanto su capacidad de convertirse en maleza es nula.

El algodón ***B2RF*** es fenotípicamente igual que los algodones convencionales, tanto en México como en otras regiones del mundo. Los estudios sobre comportamiento agronómico, caracterización bioquímica y características fenotípicas y fenológicas realizadas en las regiones algodoneras del norte de México desde 2004 a la fecha, demuestran que ninguno de los atributos reproductivos, capacidad de supervivencia o latencia se modifica como resultado de las características conferidas por la modificación genética.

No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a glifosato otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas biotecnológicas con el algodón convencional se ha ratificado durante varios años en ensayos de campo y programas comerciales donde se han autorizado, lo que nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en este evento como consecuencia de la modificación genética.

Debido a lo anterior, el algodón ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913*)*, ***no es considerado como una maleza y no representa un riesgo de convertirse en maleza más allá de lo que representarían los algodones convencionales****.*

Potencial de flujo génico

Aunque el cruzamiento natural es posible, el algodón es normalmente considerado un cultivo que se autopoliniza (Niles y Feaster, 1984). Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. El polen se puede transferir por insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas mieleras.

Literatura reciente sobre algodón muestra que la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen. McGregor (1976) rastreó el movimiento de polen por medio de marcaje con partículas fluorescentes y encontró que, incluso entre flores localizadas a 150-200 pies de un campo de algodón rodeado de numerosas colonias de abejas para asegurar una buena oportunidad de transferencia de polen, las partículas se detectaron sólo en 1.6% de las flores.

Dadas las características fenotípicas, fenológicas y reproductivas del cultivo del algodón (que no se modifican en el algodón ***B2RF***), el cruzamiento de variedades tetraploides de ***B2RF*** con especies silvestres diploides resulta altamente improbable. Además, esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide.

En caso de presentarse polinización efectiva (el polen del algodón sólo es viable durante 24 horas y presenta poca capacidad de dispersión), las plantas híbridas triploides resultantes no podrían propagarse. Esto porque aunque usualmente crecen y desarrollan terminaciones florales, no forman polen viable debido a que los pares están desbalanceados y a la segregación de los cromosomas. Esto es de gran importancia porque en la evolución de las plantas, la ploidía se ha incrementado a partir de tales hibridaciones y se ha establecido que el *Gossypium* tetraploide (algodón cultivado) se originó de esta manera. Sin embargo, las observaciones empíricas indican que el proceso en este género es extremadamente raro y está ejemplificado por una sola ocurrencia.

Finalmente, todas las especies conocidas de *Gossypium* diferentes a las tetraploides poseen el mismo número de cromosomas (n=13). No se ha generado en la naturaleza otra ploidía en este género que haya sobrevivido hasta nuestros días. Esto es particularmente importante para México debido a que las especies tetraploides y diploides han coexistido por más de un millón de años (Wendel, 1989) y no se tienen registro de especies hexaploides, lo cual apoya la baja probabilidad de entrecruzamiento del algodón cultivado con sus parientes silvestres.

Las consecuencias ambientales de la transferencia de polen del evento ***B2RF*** a otros algodones es considerada despreciable debido a la limitada movilidad del polen del algodón, la inocuidad de las proteínas introducidas y la falta de cualquier ventaja selectiva conferida en la planta de algodón receptora. Se estima que el flujo génico interespecífico ocurra a niveles muy bajos, disminuyendo rápidamente a casi cero con el incremento de la distancia entre la fuente de polen y los receptores. En general, el potencial de entrecruzamiento con parientes silvestres es poco probable debido al relativo aislamiento de la distribución de especies del genero *Gossypium*, diferentes sistemas de cruzamiento e incompatibilidad genética.

El evento ***B2RF*** (MON-15985-7 x MON-88913-8) ***no exhibe ninguna característica fenotípica que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas***, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso remoto de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de la característica de tolerancia a glifosato a especies en hábitats no agrícolas no conferiría ventaja competitiva alguna, dado que la tecnología funciona como una protección ante estímulos externos como la presión de insectos y aplicaciones de glifosato, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional **(Ver Carpeta de Reportes USDA).**

V.c. Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen (descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad)

El algodón ***B2RF*** fue desarrollado utilizando métodos de cruzamiento convencional a partir de variedades de algodón que expresan los genes Bollgard®II (MON-15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8) de manera independiente, por lo tanto posee los genes *cry1Ac*, *cry2Ab* y *cp4 epsps* y expresa las proteínas Cry1Ac, Cry2A y CP4 EPSPS provenientes de las líneas parentales ***B2*** y ***RF*****.** Estas proteínas le confieren resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia la herbicida glifosato.

En Estados Unidos, país de origen, se han realizado estudios acerca de la seguridad de la liberación del algodón biotecnológico evento ***B2RF*** y se han sometido documentos con los resultados a la Agencia de Protección Ambiental de dicho país (EPA, Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés) y a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés), en los cuales se expone la seguridad ambiental y de consumo de las proteínas insertadas en el evento ***B2RF*****.**

Para la proteína Cry1Ac expresada en los algodones biotecnológicos que contienen la tecnología Bollgard® o Bollgard®II, se sometió información ante la EPA acerca de la caracterización del gen *cry1Ac* y la proteína que expresa (Cry1Ac), niveles de expresión y seguridad de la proteína para mamíferos, toxicidad para organismos no blanco y seguridad ambiental de dicha proteína **(ANEXO 13. Resumen de solicitud Bollgard® US EPA)**.

Para la proteína Cry2Ab expresada en los algodones biotecnológicos que contienen la tecnología Bollgard®II, se sometió información ante la EPA acerca de la seguridad de la proteína Cry2Ab que incluyó estudios de caracterización y expresión de la proteína Cry2Ab, digestión *in vitro*, similitud con secuencias de alérgenos y toxinas, análisis de toxicidad aguda oral en ratones y consumo humano aproximado **(ANEXO 14. Resumen de solicitud Bollgard®II US EPA)**.

Para la proteína CP4 EPSPS expresada en los algodones biotecnológicos que contienen la tecnología Solución Faena® o Solución Faena Flex® (como ***B2RF***), se sometió información a la FDA acerca de la seguridad de la proteína CP4 EPSPS que incluyó estudios de desarrollo del evento, caracterización y niveles de expresión de la proteína, consumo aproximado, alergenicidad, similitud con secuencias de alérgenos y toxinas, simulaciones de digestión gástrica *in vitro*, composición proximal y nutricional **(ANEXO 23. Evaluación Solución Faena Flex® US FDA).**

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

En los **ANEXOS 13**, **14** y **23** se discuten estudios muy completos acerca de lo relacionado a la caracterización y seguridad del evento ***B2RF***. Además, los estudios costo-beneficio realizados en los programas experimentales y pilotos en las regiones algodoneras del norte de México, demuestran el beneficio económico producto de la diferencia en rendimiento y ahorros en aplicaciones de insecticidas, herbicidas y actividades culturales.

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

A continuación se presenta la documentación que acredita que el OGM está permitido en el país de origen para su liberación al ambiente:

a) Desregulación del algodón Bollgard®II (MON-15985-7 x MON-88913-8) por parte de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) el 8 de septiembre de 2008 **(ANEXO 24. Bollgard®II EPA)**.
b) Desregulación del algodón Bollgard®II (MON-15985-7 x MON-88913-8) por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 **(ANEXO 25. Bollgard®II FDA)**.
c) Desregulación del algodón Bollgard®II (MON-15985-7 x MON-88913-8) por parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 **(ANEXO 26. Bollgard®II USDA).**
d) Desregulación del algodón Solución Faena Flex® (MON-88913-8) por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus

siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 **(ANEXO 27. Solución Faena Flex® FDA).**

e) Desregulación del algodón Solución Faena Flex® (MON-88913-8) por parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) del 8 de septiembre de 2008 **(ANEXO 28. Solución Faena Flex® USDA).**

VI. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RIESGOS DE LAS ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS CON QUE SE CUENTE PARA CONTENDER CON EL PROBLEMA PARA EL CUAL SE CONSTRUYÓ EL OGM, EN CASO DE QUE TALES ALTERNATIVAS EXISTAN

El algodón biotecnológico ***B2RF*** (MON-15985 x MON-88913-8) se produjo por medio de cruza convencional a partir de los eventos Bollgard®II (MON-15985-7) y Solución Faena Flex® (MON-88913-8). Por lo tanto posee las proteínas insertadas en cada línea parental. Las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab heredadas de Bollgard®II le confieren la resistencia al ataque de larvas de insectos lepidópteros; y la proteína CP4 EPSPS heredada de Solución Faena Flex® le confiere la tolerancia al herbicida de amplio espectro, glifosato.

El algodón ***B2RF*** ofrece a los agricultores alternativas adicionales para aumentar la eficiencia del control de maleza y del control de plagas blanco en el cultivo de algodón. Hablando en general, ***B2RF*** no requiere cambios en las prácticas agronómicas, sin embargo, se esperan cambios específicos en las prácticas respecto a los rasgos de resistencia a insectos y tolerancia al herbicida glifosato. Estas características proveen los beneficios del producto. Los mayores beneficios del uso de la tecnología ***B2RF*** para los productores son:

I. Control de un amplio espectro de especies de maleza: los herbicidas Roundup® controlan de manera eficiente y segura la maleza de hojas anchas y gramíneas, incluso las especies resistentes a otros herbicidas (Franz *et al.,* 1997).

II. Mayor flexibilidad para el control de maleza: en los cultivos tolerantes a glifosato, éste es aplicado sobre la maleza después de la emergencia del cultivo. Las aplicaciones son necesarias sólo cuando la infestación de maleza alcanza niveles de daño económico, pudiendo reducir la productividad y la calidad del producto.

III. Alta compatibilidad con técnicas de conservación de suelo: los beneficios del barbecho, preparación conservacionista de suelo, como plantío directo (Maschio, 2004; Embrapa, 2003; Mello, 2002), incluyen la mejora de la calidad del suelo, el aumento de la infiltración de agua, la reducción de la erosión y de sedimentos en las fuentes de agua, la reducción de la perdida de nutrientes y pesticidas para las aguas de superficie, la mejora del hábitat para la vida silvestre, la mejora de la retención de carbono en el suelo, la reducción del

uso de combustible y la utilización de prácticas agrícolas más sustentables (Warburton y Klimstra, 1984; Edwards *et al.,* 1988; Hebblethewaite, 1995; Reicosky, 1995; Reicosky y Lindstrom, 1995; Keeling *et al.,* 1998; CTIC, 1998; CTIC, 2000).

IV. Uso de un herbicida con bajo riesgo para la salud humana: en las condiciones de uso de los productos registrados y en las recomendaciones técnicas, el glifosato no causa efectos adversos sobre la salud humana (U.S. EPA, 1993; WHO, 1995; Williams *et al.,* 2000).

V. Disminución de los costos para el control de maleza: el costo del control realizado con glifosato es competitivo en relación al costo de opciones alternativas de control, especialmente en función de la gran eficacia del control de maleza. Tanto grandes como pequeños productores se benefician de esta tecnología de manera semejante.

VI. Reducción de la necesidad de pulverizar insecticidas convencionales para el control de las principales plagas de algodón, como *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella* y *Helicoverpa zea* y otros insectos del orden *Lepidoptera*. A través de la expresión de la proteína Cry1Ac y Cry2Ab, los algodones ***B2RF*** controlan los daños causados por estos insectos a lo largo de la temporada y proporciona un mayor rendimiento con un menor número de aplicaciones de insecticidas de amplio espectro.

VII. Una menor exposición a los insecticidas reduce el riesgo para la salud humana.

Disminución de los costos para el control de plagas blanco: el costo del control realizado con la reducción en el uso de insecticidas en relación al costo de opciones alternativas de control. Tanto como pequeños productores se benefician de esta tecnología de manera semejante.

Los resultados en países donde el algodón es producido por pequeños productores demuestran que esta tecnología trae beneficios tanto para los pequeños agricultores, con producción menos sofisticada, como también para los grandes agricultores, que practican una producción técnicamente más avanzada.

Las alternativas al uso de los eventos biotecnológicos de Monsanto son el uso de insecticidas y herbicidas alternos con el impacto al ambiente que esto supone.

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

Se anexa la documentación que acredita que las variedades de algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® están permitidas para su industrialización y consumo humano en México (**ANEXO 22. Permiso de Secretaría de Salud para *B2RF***).

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

La presente solicitud de liberación al ambiente en **ETAPA EXPERIMENTAL** para el organismo genéticamente modificado algodón ***B2RF*** (evento MON- 15985-7 x MON-88913-8) contempla el ciclo Primavera – Verano de 2013 en la región agrícola de **Tamaulipas Sur.**

La siembra de algodón ***B2RF*** está sujeta al periodo oficial de siembra establecido por la Delegación Estatal de la SAGARPA. Por tal motivo, ***se solicita atentamente*** que la vigencia del permiso no se asigne de acuerdo a una fecha específica, sino que se adapte al periodo de siembra que determine dicha entidad, ***tomando en cuenta como finalización del ciclo agrícola la etapa de despepite y asimismo se considere la entrega de reportes finales a partir del último día de despepite*.**

A. La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte

Para el ciclo agrícola PV-2013 en la región **Tamaulipas Sur** se solicitan 25,000 hectáreas y 359,375 kg de semilla de algodón ***B2RF*** para sembrarse a una densidad de 14 kg/ha **(Cuadro 2, pag. 81 de esta solicitud)**.

Ruta de movilización

Monsanto importa la semilla de algodón biotecnológico de Estados Unidos de América de acuerdo a la cantidad especificada en el permiso correspondiente y se almacena en los almacenes especificados en las solicitudes de permiso de liberación al ambiente.

En ocasiones hay excedentes de semillas en algunas regiones y faltantes en otras, por lo que solicitamos atentamente el poder movilizar y comercializar la semilla entre los almacenes y regiones donde se hayan aprobado permisos para esta tecnología (B2RF) por la autoridad. Para esto la promovente proporcionará a la autoridad registros actualizados de inventarios de semilla en las regiones donde se cuente con permiso de liberación al ambiente.

Lugar de origen de la semilla:

Delta & Pine Land 100 Main St. Scott, MS 38772	**Delta & Pine Land** Highway 70 Aiken, TX 79221	**Delta & Pine Land** 15790 S. Highway 87 Eloy, AZ 85231	**Delta and Pine Land Co.** 610 2nd Street. Indianola, MS 38751

Destinos intermedios:

Agencias aduanales.

	ADUANA	DIRECCIÓN	MUNICIPIO	LATITUD	LONGITUD (-)	LATITUD	LONGITUD (-)
1	GUADALAJARA	Aeropuerto Internacional Miguel Hidalgo.Municipio de Tlajomulco de Zuñiga. Guadalajara, Jal. CP 45659	Tlajomulco de Zuñiga	20°31'28.98"N	103°17'58.76"W	20.524717°	-103.299656°
2	TOLUCA	Boulevard Miguel Alemán Valdés esq. Agustín, Millán, Col. San Pedro Totoltepec, Toluca, Edo. De México. CP 50200	Toluca	19°20'15.90"N	99°34'16.60"W	19.337750°	-99.571278°
3	NUEVO LAREDO	Carretera Nuevo Laredo-Piedras Negras Km. 12.5, Puente Internacional de Comercio Mundial Nvo. Laredo III	Nuevo Laredo	27°35'42.67"N	99°32'41.42"W	27.595186°	-99.544839°
		Puente Internacional 2 "Juárez-Lincoln", Av. Leandro Valle y 15 de junio, Plataforma Fiscal, Sector Centro, Nuevo Laredo, Tamps, CP 88000	Nuevo Laredo				
4	MATAMOROS	Acción Cívica y División del Norte s/n, Col. Doctores. 87340, Matamoros, Tamps. Teléfonos: (01 868) 8 11 01 01; 8 11 01 30	Matamoros	25° 52' 47" N	97° 30' 15" W	25.879722°	-97.504167°
5	NOGALES	Puerto Fronterizo Nogales III. Nuevo Corredor Fiscal Km. 12, 84000, Nogales, Son. Teléfonos: (01 631) 3 11 03 01; 3 11 03 02	Nogales	31° 19' 7" N	110° 56' 45" W	31.318611°	-110.945833°
6	MEXICALI	BLVD. Abelardo L. Rodríguez. Col. Alamitos, S/#. CP 21210. Teléfonos: (01 686) 551-52-11	Mexicali	Pendiente			
7	CD. JUAREZ	Sección Aduanera del Puente Internacional Zaragoza Isleta S/N Col. Waterfil , Cd. Juárez, Chih, Mexico	Cd. Juarez				

Destino final:

Centros de distribución para la región de Tamaulipas Sur.

Región	Centro de Distribución MONSANTO	Dirección	Estado	Latitud	Longitud
Mexicali, San Luis Río Colorado, Sonora Norte	SAM Logística	Km. 12.5 Carretera islas Agrarias S/N, Col. Abasolo, Mexicali, Baja California, CP 21600.	Baja California	32º 38' 4.91'' N	115º 20' 54.04'' O
Comarca Lagunera	Accel Logística	Luis F. García No. 279, Zona Industrial, Torreón, Coahuila, CP 27019.	Coahuila	25º 35' 17.62'' N	103º 23' 47.13'' O
Chihuahua	Distribuidora Agrícola Miller	Ave. Ferrocarril Norte #400 col. Lotes Urbanos, Cd. Delicias, Chihuahua, CP 33000.	Chihuahua	28º 12' 6.24 N	105º 28' 7.18'' O
Sonora Sur	Semillas y Agroproductos Monsanto, S.A. de C.V.	Carretera Internacional Km.1616, Zona Industrial, Los Mochis, Sinaloa CP 81200.	Sinaloa	25º 47' 6.46'' N	108º 53' 43.78'' O

Almacenes de distribuidores para la región de Tamaulipas Sur.

Región	Distribuidor	Dirección	Latitud	Longitud
Chihuahua	MIRANDA ANTILLÓN ROBERTO (MILLER)	Av. Ferrocarril Norte #400, Col. Lotes Urbanos, Delicias, Chihuahua.	28.201503	-105.468721
Chihuahua	SEMILLAS PRODUCTIVAS, S.A. DE C.V. (FERTIFUM)	Domicilio conocido, Col. El Oasis, Municipio de Ojinaga.	28.92701	-104.67381
Chihuahua	ALGODONES GUTIÉRREZ, S.A. DE C.V.	Carretera Juárez – Porvenir Km. 45, Municipio de Guadalupe, Chihuahua.	31.41652	-106.1503
Comarca Lagunera	SOCIEDAD COOPERATIVA AGROPECUARIA	Cuatrociénegas S/N, Parque Industrial Lagunero, Gómez Palacios, Durango. CP 35070.	25.55623	-103.47279
Mexicali	INSUMOS AGRÍCOLAS BONATERRA, S.A.	Carretera a San Luis Río Colorado, crucero al Ejido Nuevo León, Col. Pólvora, Mexicali, Baja California.	32.5457	-115.2123
Mexicali	TECNIAGRO DEL RÍO COLORADO, S. DE R.L.	Km. 21 Carretera San Luis – Riito, Ej. Lagunitas, San Luis Río Colorado, Sonora.	32.3538	-114.9224
Sonora Sur	AGROS DE CAJEME, S.A. DE C.V.	Boulevard Norman Bourlaugh #1415 Sur. Cd. Obregón, Sonora.	27.47869	-109.93193
Tamaulipas	**JEMAGO**	**Av. Francisco I. Madero No. 101 Col. Popular, Cd. Río Bravo, Tamaulipas. CP 88980**	**25.98003**	**-98.07366**
Sonora Norte	TECNIAGRO DEL RÍO COLORADO, S. DE R.L.	Km. 21 Carretera San Luis – Riito, Ej. Lagunitas, San Luis Río Colorado, Sonora.	32.3538	-114.9224

Región	Distribuidor	Dirección	Latitud	Longitud
Sinaloa	AGROPRODUCTOS ALFER, S.A. DE C.V.	Oficina y Bodega: Blvd. Macario Gaxiola No. 755-A Pte. Fraccionamiento El Parque. Los Mochis, Sin. C.P. 81200	N 25º 47' 35.2''	W 108º 58' 29.9''
		Bodega Zona Industrial: Blvd. Topolobampo S/N Zona Industrial Jiquilpan. Los Mochis, Sin. C.P. 81255	N 25º 47' 35.8''	W 108º 57' 10.6''
		Bodega Guasave: Av. Niños Héroes S/N Guasave, Sin. C.P. 81200	N 25º 34' 43.1''	W 108º 27' 44.0''
		Bodega Culiacán: Ferrocarril del Pacífico #12221 Aguaruto, Culiacán, Sin.	24.77354	-107.50769
Sinaloa	AGROSERVICIOS CASAS GRANDES, S.A. DE C.V.	Oficina y Bodega: Blas Valenzuela No. 51 Col. Centro. Guasave, Sinaloa. C.P. 81000	N 25º 34' 3.1''	W 108º 27' 50.0''
Sinaloa	NUEVA AGROINDUSTRIAS DEL NORTE, S.A. DE C.V.	Oficina y Bodega: Carretera a El Dorado Sur No. 4625, Campo El Diez. Culiacán, Sin.	N 24º 41' 54.6''	W 107º 26' 40.8''
		Bodega Los Mochis: Blvd. Adolfo López Mateos No. 2095 Nte. Col. Las Fuentes, Los Mochis, Sin. C.P. 81223	N 25º 34' 38.1''	W 108º 27' 56.2''
		Bodega Guasave: Blvd. Central No. 1134, Col. Ejidal. Guasave, Sin C.P. 81020	N 25º 34' 38.1''	W 108º 27' 56.2''
Sinaloa	INDUSTRIAL ALGODONERA COREREPE, S.A. DE C.V.	Oficina Los Mochis: Fuente de Marte No. 375 Local 20 Los Mochis, Sin. C.P. 81223	N 25º 48' 29.8''	W 108º 58' 53.1''
		Bodega Zona Industrial: Carretera Internacional México-Nogales km 1,619.5 Los Mochis, Sin.	N 25º 47' 16.6''	W 108º 53' 43.5''
Sinaloa	DEL FUERTE COTTON, S.A. DE C.V.	Oficina: Av. Independencia No. 1600, Col. Jardines del Valle	**Es sólo oficina**	
		Bodega: Calle 0 y Carretera Internacional. A. Ruíz Cortínez, Guasave, Sin.	N 25º 41' 54.4''	W 108º 42' 2.8''
		Bodega: Carretera Internacional y Calle 2. A. Ruíz Cortínez, Guasave, Sin.	N 25º 42' 1.6''	W 108º 42' 3.2''

Transporte de la semilla

a) La semilla será movilizada por vía terrestre mediante camiones y para su manejo se seguirán las medidas de bioseguridad descritas en el punto 1 (Transporte y almacenamiento de material vegetal experimental modificado por ingeniería genética) del **PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD GENERAL PARA ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS** (OGM).

b) Las semillas de algodón ***B2RF*** 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.
c) Al documentar los embarques de semilla, se harán todas las especificaciones pertinentes a la compañía transportadora para que el material sea maniobrado con cuidado y evitar rompimiento, mutilación o daño físico de las bolsas. Los envases (bolsas) estarán claramente identificados mediante etiquetas visibles. Para mayor detalle ver el **ANEXO 19. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD GENERAL.**
d) Los envases (bolsas) estarán claramente identificados mediante etiquetas visibles.

Etiquetado de los envases

Todos los envases individuales estarán etiquetados con la siguiente información en idioma español:

- **Nombre comercial:** Algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex®.
- **Nombre del evento:** MON 15985 x MON 88913
- **Identificador único OECD:** MON-15985-7 x MON-88913-8.
- **Característica:** El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® (MON-15985-7 x MON-88913-8) se obtuvo mediante cruza convencional a partir de los eventos MON-15985-7 y MON-88913-8. El algodón Bollgard®II/Solución Faena Flex® contiene los genes *cry1Ac* y *cry2Ab* de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* que le confieren resistencia al ataque de insectos del 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), y dos copias del gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 que le confieren tolerancia al herbicida glifosato.
- **Tipo de material que se envía**: Semilla
- **Contenido neto:** Dependiendo del tamaño de la semilla, cada bolsa contiene 250,000 semillas con un peso que varia de 21 a 25 kg/bolsa.
- **Nombre, dirección y teléfono del proveedor de la semilla:**

Si se utiliza un envase secundario (embalaje) éste también se etiquetará de manera visible con la información del inciso anterior y especificará la cantidad de envases individuales que contiene.

Documentación para el transporte de la semilla de algodón B2RF.

a) Lista de inventario de todos los envases, embalajes y materiales que se envían especificando la fecha de envío.
b) Guía original de transporte especificando claramente la fecha de envío.
c) La guía de transporte y la lista de inventario debe enviarse vía fax o correo electrónico a la persona autorizada para recibir la semilla con anticipación al envío.

d) El exportador debe mantener copias de todos los documentos que acompañan el envío, incluyendo copia del permiso de importación y del certificado fitosanitario internacional.
e) Todos los documentos relacionados con el transporte de la semilla de algodón ***B2RF*** deben mantenerse bajo resguardo.

Recepción de los materiales transportados.

a) Verificación de la lista de inventario.
b) Los materiales deben mantenerse en un lugar seguro hasta que se confirme que la lista de inventario enviada coincide físicamente con los materiales recibidos.
c) Verificar el estado de los envases y confirmar que los sellos de seguridad no fueron abiertos.
d) En caso de que los envases hayan sido abiertos se debe comprobar que no se haya perdido el material, verificando el peso o cantidad de semilla enviada[8].

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 Monsanto sea notificada.
b) Notificar a todas las personas autorizadas y con capacidad de decisión con relación al algodón ***B2RF***.
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.

Procedimiento para el almacenamiento de la semilla de algodón B2RF.

a) El área destinada para almacenar la semilla de algodón ***B2RF*** debe ser, identificada en forma clara.
b) El área destinada para el almacenamiento de la semilla debe ser limpiada exhaustivamente antes y después del periodo de almacenamiento.

[8] Cuando se trate de un OGM de importación se debe considerar que en las inspecciones que realiza la SAGARPA en las aduanas de entrada al país generalmente se toman muestras para análisis fitosanitario.

c) Las entradas y salidas de material deben ser debidamente documentadas en el inventario del almacén.

De esta manera, se minimizan los riesgos de liberaciones no deseadas. En caso de ocurrir algún accidente o liberación no deseada, Monsanto se compromete a informar a la autoridad y a tomar las medidas correspondientes para mitigar dicha liberación.

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

Los protocolos que se han utilizado durante las evaluaciones experimentales en las regiones algodoneras del norte de México son los siguientes:

1.- PROTOCOLO DE EVALUACIÓN AGRONOMICA DE VARIEDADES DE ALGODÓN (ANEXO 29).

2.- PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE DINAMICA (DOMINANCIA Y FLUCTUACIÓN) DE MALEZA EN PLANTACIONES DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO EN MÉXICO (ANEXO 30).

3.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LEPIDOPTEROS BLANCO DE LA TECNOLOGÍA BOLLGARD® Y BOLLGARD®II (ANEXO 31).