SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE DE ALGODÓN GlyTol® TwinLink™ (GHB614 x T304-40 x GHB119); BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 EN ETAPA EXPERIMENTAL, EN LA REGIÓN AGRÍCOLA DE TAMAULIPAS, CICLO P – V 2016.

Compañía:

Bayer de México, S.A. de C.V.
Boulevard Miguel de Cervantes Saavedra No. 259
Ampliación Granada
11520 México, D.F.
Tel. (55) 57 28 30 00

México, D.F., a 7 de julio de 2015.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS 7
LISTA DE FIGURAS 9
ANEXOS 11
1. Nombre, denominación o razón social de quien promueve. ... Error! Bookmark not defined.**15**
2. Nombre de los responsables del seguimiento a las pruebas de campo (Se autoriza de acuerdo al artículo 5 del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados para recibir notificación vía electrónica). 15
3. Otras personas involucradas en las pruebas de campo y que tengan capacidad de decisión sobre éstas. 15
4. Personas que desarrollaron el producto y que pueden ampliar la información 16
5. *Currículum Vitae* de los involucrados en la liberación del OGM 16
I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. 19
a) Identificador único del evento de transformación, de organismos internacionales de los que México sea parte, cuando exista; 19
b) Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México. 19
c) Especificación de la existencia de especies sexualmente compatibles. 23
d) Descripción de los hábitats donde el OGM puede persistir o proliferar en el ambiente de liberación 24
e) Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética. 25
f) País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido. 27
g) Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor. 28
h) Secuencia génica detallada del evento de transformación, incluyendo tamaño del fragmento insertado, sitio de inserción de la construcción genética, incluyendo las secuencias de los oligonucleótidos que permitan la amplificación del sitio de inserción. 31
i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, y los resultados de los experimentos que comprueben los datos anteriores, así como la expresión de mensajeros del evento de transformación genética, incluyendo la demostración de los resultados. 32
j) Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres producto de los genes insertados, expresión de las proteínas y localización de las mismas; 44
k) Descripción del método de transformación. 50

l) Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de los efectos no esperados. 50
m) Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas por el OGM, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples. 51
n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios. 53
o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos. 55
p) Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras incluyendo promotores, terminadores y otras, y su descripción, número de copias insertadas, pertenencia de éstas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora....60
q) Patogenicidad o virulencia de los organismos donadores y receptores de los organismos donadores. 61
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. 63
s) Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgen. 65
t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados. 65
II. Identificación de la zona o zonas donde se pretenda liberar el OGM: 66
a) Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación 66
b) Ubicación, en coordenadas UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación, y66
c) Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según las características de diseminación del OGM de que se trate. 68
1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos. 68
2. Descripción geográfica. 69
III. Estudio de los posibles riesgos que la liberación de los OGMs pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica a los que se refiere el artículo 42, fracción III, de la Ley. Contendrá, además de lo dispuesto en el artículo 62 de la Ley, la información siguiente: 72
a) Estabilidad de la modificación genética del OGM. 72
b) Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína de interés en los diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren. 72
c) Características del fenotipo del OGM. 74

d) Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y en el medio ambiente receptor del OGM. 74
e) Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya al menos, ciclo biológico y cambios en la morfología básica. 74
f) Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que se puedan derivar de la liberación del OGM. 76
g) Descripción de uno o más métodos de identificación del evento específico del OGM, incluyendo niveles de sensibilidad y reproducibilidad, con la manifestación expresa del promovente de que los métodos de identificación son los reconocidos por el desarrollador del OGM para la detección del mismo. 77
h) Existencia de potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas. 77
i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados. 77
IV. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad y de bioseguridad a llevar a cabo. 78
a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad: 78
1. Plan de monitoreo detallado. 78
2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM, con el fin de detectar cualquier interacción entre el OGM y especies presentes relevantes, directa o indirectamente, en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación, cuando existan. 79
3. Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación. 80
b) Medidas y procedimientos de bioseguridad. 81
1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación. 81
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. 82
3. Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas. 83
4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar experimentalmente el OGM 83

5. Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado.....83
6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación. 84
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.....84
a) Descripción de la zona en donde se realizó la liberación. 84
b) Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna. 87
c) Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen, cuando haya sido requerido por la autoridad de otro país y se tenga acceso a él. La descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad establecidos deberá incluirse en el estudio.....91
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.. 95
e) En caso de importación, copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen, al menos para su liberación experimental, traducida al español. La Secretaría competente, de considerarlo necesario, podrá requerir copia simple de la legislación aplicable vigente en el país de exportación traducida al español.....105
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. 106
VII. Número de autorización expedida por SALUD cuando el OGM tenga finalidades de salud pública o se destine a la biorremediación. En caso de no contar con la autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente anexa a un escrito libre, en el que se indique el número de autorización;.....110
VIII. La propuesta de vigencia para el permiso y los elementos empleados para determinarla.....110
Informacion Adicoinal.....111
A) La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte......111

B) El diseño experimental que se llevarán a cabo durante la liberación en etapa experimental..115

Referencias.....115

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Distribución de especies de *Gossypium* en México	19
2	Contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™.	37
3	Niveles de la proteína 2mEPSPS en tejidos de la planta del algodón GlyTol®	40
4	Elementos genéticos del vector pTDL008 que fueron insertados en el genoma de la planta	45
5	Elementos genéticos del vector pTEM12 que fueron insertados en el genoma de la planta	46
6	Análisis de segregación de los eventos independientes en el algodón TwinLink™	47
7	Elementos genéticos del vector pTEM2 que fueron insertados en el genoma de la planta	48
8	Análisis de segregación del Evento de Transformación GlyTol®	49
9	Cantidades de proteína PAT en subproductos procesados del algodón Evento LLCotton25® por ELISA y expresado como porcentaje de Proteína Cruda	58
10	Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Norte del estado de Tamaulipas.	66
11	Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Sur del estado de Tamaulipas.	67
12	Superficie de sitios Ramsar cercanos a los polígonos propuestos de liberación.	71
13	Contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™. El contenido de las proteínas es expresado en µg/g peso fresco	73
14	Niveles de la proteína 2mEPSPS en tejidos de la planta del algodón GlyTol®	73
15	Hábito de crecimiento y morfología de la planta en varias regiones de los EE UU. Comportamiento del algodón TwinLink™ y la variedad Coker, con aplicación y sin la aplicación del herbicida glufosinato de amonio (GA)	75
16	Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2004	75
17	Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2005	76
18	Estatus Regulatorio del algodón TwinLink™ en otros países.	85
19	Superficie sembrada con algodón en Estados Unidos 2013 – 2014.	86

20	Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodonero (CICOPLAFEST, 1998; SAGAR, 2000; PLM, 2006)	96
21	Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados	102
22	Consumo de combustible por el uso del tractor, por método de labranza	109
23	Impacto de cambios en el uso de herbicidas e insecticidas por la cultivación global de los cultivos GM de 1996 a 2006	110

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Mapa de distribución generado por la consulta a Fryxell (1979) y colección del Herbario Nacional “MEXU” (1998), del Instituto de Biología de la UNAM.	22
2	Mapa de distribución generado por la consulta al REMIB en la página de la CONABIO (2006)	23
3	Distribución puntual de *G. hirsutum L*., de sus parientes silvestres, con los que puede hibridizar y tener descendencia viable en México.	24
4	Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento T304-40	33
5	Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis Southern Blot del evento T304-40.	34
6	Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento GHB119	35
7	Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis Southern Blot del evento GHB119	36
8	Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento GlyTol® mostrando a estrategia de hibridación	38
9	Resultados del análisis Southern Blot del algodón GlyTol® (T-DNA probe).	39
10	Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *2mepsps* ADN-T	42
11	Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *cry1Ab-bar* ADN-T	42
12	Demostración de la estabilidad de GLT para la sonda del gene *cry1Ab*	43
13	Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *cry2Ae-bar* ADN-T	43
14	Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008	44
15	Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008	46
16	Representación esquemática de la estructura del plásmido pTEM2	48
17	Polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Norte del estado de Tamaulipas.	67
18	Polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Sur del estado de Tamaulipas.	68
19	Municipios comprendidos dentro del polígono de liberación de algodón GLT del Norte y Sur del estado de Tamaulipas.	69
20	Áreas Naturales Protegidas cercanas al polígono de liberación del Norte y Sur del estado de Tamaulipas.	70
21	Sitios Ramsar que se traslapan con el polígono del Norte y Sur del estado de Tamaulipas.	71
22	Principales tipos climáticos de Estados Unidos.	87

23	Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a los herbicidas en los países que han adoptado esta tecnología de 1996-2006	109
24	Ruta de movilización de Cd. Juárez a delicias, Chihuahua.	111

ANEXOS

Anexo

A	Evaluación agronómica y ambiental de la tecnología GlyTol® TwinLink™ en algodón en etapa experimental en Tamaulipas durante el ciclo agrícola PV-2016.
1	Fryxell, P. 1979. The Natural History of the Cotton Tribe.
2	Murakami, T., Anzai, H., Imai, S.,Sathah, A., Nagaoka, K. and Thompson, C.J. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster.
3	Moens, S. and De Pestel, K. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40.
4	Verhaeghe, S. and Habex, V. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119.
5	Habex V., Lecleir M. 2006. Demonstration of the nature of the flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614.
6	Van der Klis R.J., Hendrickx K., Hérouet-Guicheney C., Rouan D. 2006. The double mutant 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase gene product: 2mEPSPS. Description and characterization.
7	Habex V. 2007. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614.
8	Zambryski, P. 1988. Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells.
9	Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter.
10	Thompson, C.J., Movva Rao, N., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*.
11	Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence.
12	Bayer, E., Gugel, K. H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W.A. and Zähner, H. 1972. Phosphinothricin and phosphinothricyl-alanyl-alanine.
13	Miflin, B.J. and Lea, P.J. 1977. Amino acid metabolism.
14	Sadaaki Mase. 1984. Meiji Herbiace: common name bialaphos: a new herbicide.
15	Wild, A., Sauer, H. and Rühle, W. 1987. The effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis: I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia.
16	Wendler, C. and Wild, A. 1990. Effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis and photorespiration.
17	Oberdörfer, R. 2008. Summary of the Statistical Analysis of Bt Cotton (event GHB119) vs Nontransgenic Counterpart (Coker 312).

18 Oberdörfer,R. 2007. Nutritional impact assessment report on glyphosate tolerant cotton transformation event GHB614.

19 Rouquié, D. 2007a. Cry1Ab protein - In vitro digestibility in simulated intestinal fluid. Study number SA 07111.

20 Rouquié, D. 2007b. Cry1Ab protein - In vitro digestibility in simulated gastric fluid. Study number SA 07110.

21 Rouquié, D. 2008a. Cry2Ae protein - In vitro digestibility in simulated gastric fluid. Study number SA 08126.

22 Rouquié, D. 2008b. Cry2Ae protein - In vitro digestibility in simulated intestinal fluid. Study number SA 08127.

23 Hérouet C. 2004. Assessment of the toxicity and allergenicity of the PAT protein (*bar* gene).

24 Hérouet C., Esdaile D.J., Mallyon B.A., Debruyne E., Schulz A., Currier T., Hendrick K., van der Klis R.J., Rouan D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants.

25 Oberdörfer R. 2003. Nutritional impact assessment report on glufosinate ammonium-tolerant cotton transformation event LLCotton25.

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

27 Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing Bacillus thuringiensis-derived insect control protein.

28 Berardi L.C. and Goldblatt L.A. 1980. Gossypol. In Toxic constituents of plant foodstuffs.

29 Cherry J.P., Leffler H.R. 1984. Seed. In Cotton (Kohel, R.J. and Lewis, C.F., eds.)

30 Phelps R.A., Shenstone F.S., Kemmerer R.J., Evans, R.J. 1965. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives.

31 Wild, A. and Manderscheid, R. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants.

32 Manderscheid, R. and Wild, A. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from Triticum aestivum L.

33 Bremmer, J. Ebert, E., Heusel, R., Sochor, H., Sonder, K., Stumpf, K., Weller, O. and Zumdick, A. 1997. Glufosinate-ammonium, code: AE F039866; short summary on the active substance.

34 Keys, A.J., Bird, I.F., Cornelius, M.J., Lea, P.J., Wallsgrove, R.M. and Miflin, B.J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle.

35 Ridley, S.M. and McNally, S.F. 1985. Effects of phosphinothricin on the isoenzymes of glutamine synthetase isolated from plant species which exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide.

36 Sauer, H., Wild, A. and Rühle, W. 1987. The effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis: II. The causes of inhibition of photosynthesis.

37 Mertens, K. and Moens, S. 2008. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 over different generations, in different backgrounds and grown in different environments.

38 Verhaeghe, S. and Criel, I. 2008. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments.

39 Habex, V. 2006. Structural stability analysis of GlyTol Cotton event GHB614.

40 Currier, 2009. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* combined event GLT (GHB614).

41 Vértices de polígonos solicitados

42 Polígonos de liberación

a. Polígono de liberación Norte de Tamaulipas

b. Polígono de liberación Sur de Tamaulipas

43 Mapas de carreteras

a. Mapa SCT Chihuahua

b. Mapa SCT Coahuila

c. Mapa SCT Durango

d. Mapa SCT Tamaulipas

44 Glytol Detection Method

45 LL25 Detection Method

46 T304-40 Detection Method

47 Van Deynze, A. E., Sundstorm, F.J., and Bradford, K.J. 2005. Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity.

48 Material de Capacitación en materia de Bioseguridad de OGM para Tamaulipas

49 EnviroLogix. QuickStix™ Combo Comb Kit for Multi-Trait Testing Cry1A/2Ae/2m/bar Cotton Seed

50 Autorizaciones nacionales e internacionales

a. Autorización sanitaria para comercialización e importación para su comercialización de organismos genéticamente modificados caso Algodón GlyTol® TwinLink™_COFEPRIS 2012

b. USDA Determination of nonregulated status for GlyTol™ Cotton

c. Determination of Nonregulated Status for Cotton Genetically Engineered for Insect Resistance and Herbicide Tolerance GlyTol® TwinLink™

d. TwinLink™ FDA approval letter3

e. GlyTol (GHB614) USDA notification

f. Health Canada Final Decision Letter TwinLink™

51 Zeng, L.; Meredith, W.R.; Campbell, B.T.; Dever, J.K.; Zhang, J.; Glass, K.M.; Jones, A.S.; Myers, G.O. and Bourland, F.M. 2014. Genotype by environment interaction effects on lint yield of cotton cultivars across major regions in the U.S. Cotton Belt.

52 Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol® cotton Event GHB614; OECD Unique Identifier BCS-GHØØ2-5, 2006.

53 Petition for Determination of Nonregulated Status for Insect-Resistant and Glufosinate Ammonium-Tolerant cotton: TwinLink™ cotton (events T304-40 x GHB119); OECD Unique Identifier BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8, 2008.

54 McGregor, S.E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants, Agricultural Handbook No. 496.

55 Kareiva P., Morris W., Jacobi C. 1994. Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and their wild relatives.

56 Sundstrom F.J. 2001. Pollen Transfer in Cottonseed Production.

57 Fawcett, R., Towery, D. 2004. Conservation Tillage and Plant Biotechnology: How New Technologies Can Improve the Environment By Reducing the Need to Plow.

58 Rouquié D. 2006. 2mEPSPS protein - Overall amino acid sequence homology search with known toxins and allergens. In silico study report SA 06103.

59 Duan, J.J.; Marvier, M.; Huesing, J.; Dively, G.; Huang, Z. 2008. A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae).

60 Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.M.; Capell, T. Christou, P. 2011. Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications.

61 Evidencia fotográfica sacos

62 Empaque y etiquetado semilla

63 Hoja de especificación de materiales

64 Hoja de Seguridad Transporte SEEDS

1. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DE QUIEN PROMUEVE

Bayer de México S.A. de C.V.

División CropScience

BME820511SU5

Miguel de Cervantes Saavedra No. 259

Col. Ampl. Granada, Del. Miguel Hidalgo

11520, México, D.F.

Tel. 5728 3000

I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM.

a) Identificador único del evento de transformación

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

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

Se efectuó una revisión sobre la distribución del algodón en México, la cual se complementó mediante la investigación del material conservado en el "Herbario Nacional, MEXU" del Instituto de Biología de la UNAM. Esto permitió que la información sobre la distribución de las especies del género *Gossypium* pudiera ampliarse notablemente. Lo anterior puede observarse en la tabla 1 y figura 1 presentados a continuación:

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

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

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

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

Fuente: Fryxell (1979) (Anexo 1) **y Colección del Herbario Nacional "MEXU" (1998), del Instituto de Biología de la UNAM.**



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

Por otro lado, se realizó una consulta a la **Red Mundial de Información sobre Biodiversidad: (http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remibnodosdb.html?),** donde se obtuvo la información de una serie de colectas que se describen ampliamente en este mismo punto, y que fueron realizadas para el género *Gossypium* en todo el país. Además se generó un mapa de distribución de dichas colectas que muestra y corrobora la información anterior (Fryxell, 1979 (Anexo 1) y MEXU, 1998), que indica que no existe una distribución de especies relacionadas con el algodón cultivado en la región agrícola del Norte y Sur de Tamaulipas y mucho menos aún en las áreas dedicadas al cultivo del algodonero en la región de donde se encuentran incluidas las áreas donde se pretende sembrar el algodón GlyTol® Twin Link con protección contra los insectos lepidópteros y tolerante a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato.

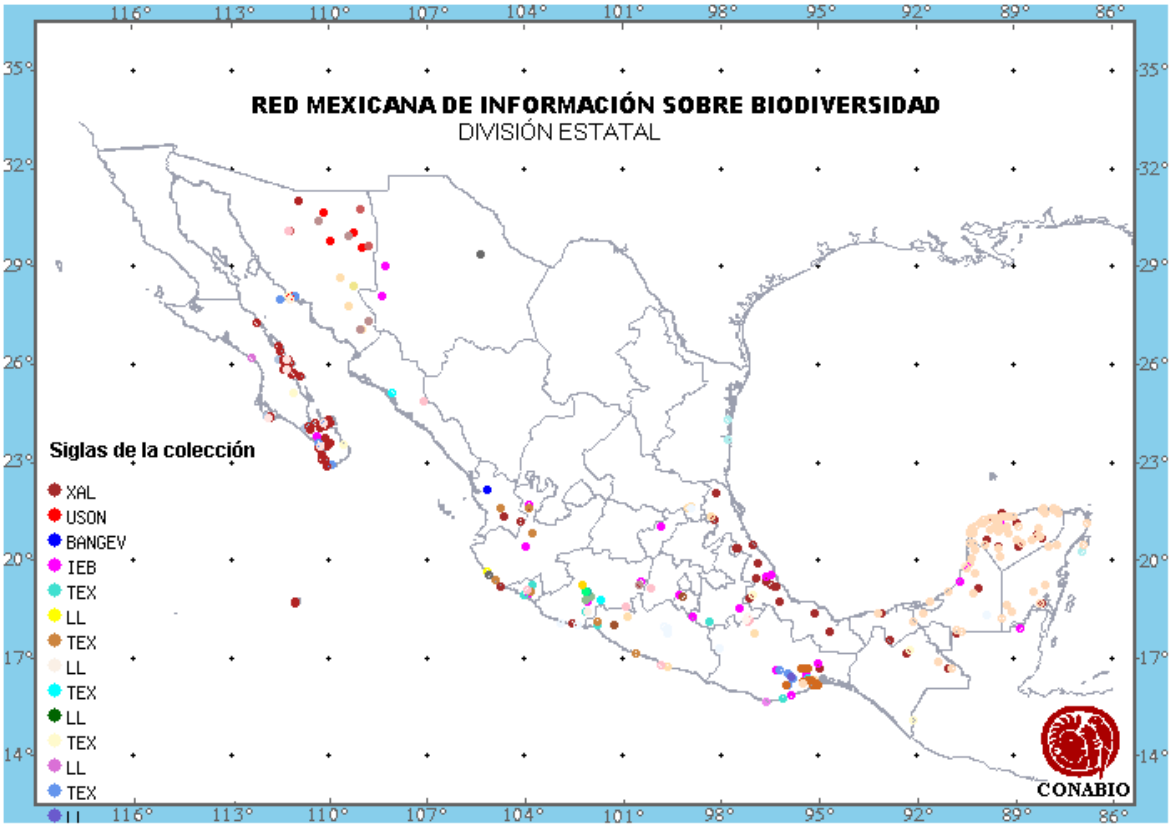


Figura 2. Mapa de distribución generado por la consulta al REMIB en la página de la CONABIO (2006)

c) Existencia de especies sexualmente compatibles.

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

De acuerdo a lo descrito por la CONABIO en 2011, no existen poblaciones silvestre cercanas al polígono de liberación del Norte del estado de Tamaulipas; se reporta una distancia del área de liberación al sitio de colecta del organismo receptor silvestre o parientes silvestres de 230 km. De igual manera, el riesgo por flujo génico es bajo, debido a que el polen es pesado y pegajoso, por lo que no puede ser transportado a largas distancias.

Para el caso del polígono Sur de Tamaulipas, el sitio de colecta disponible más cercano del organismo receptor silvestre se encuentra a 142 (Figura 3).

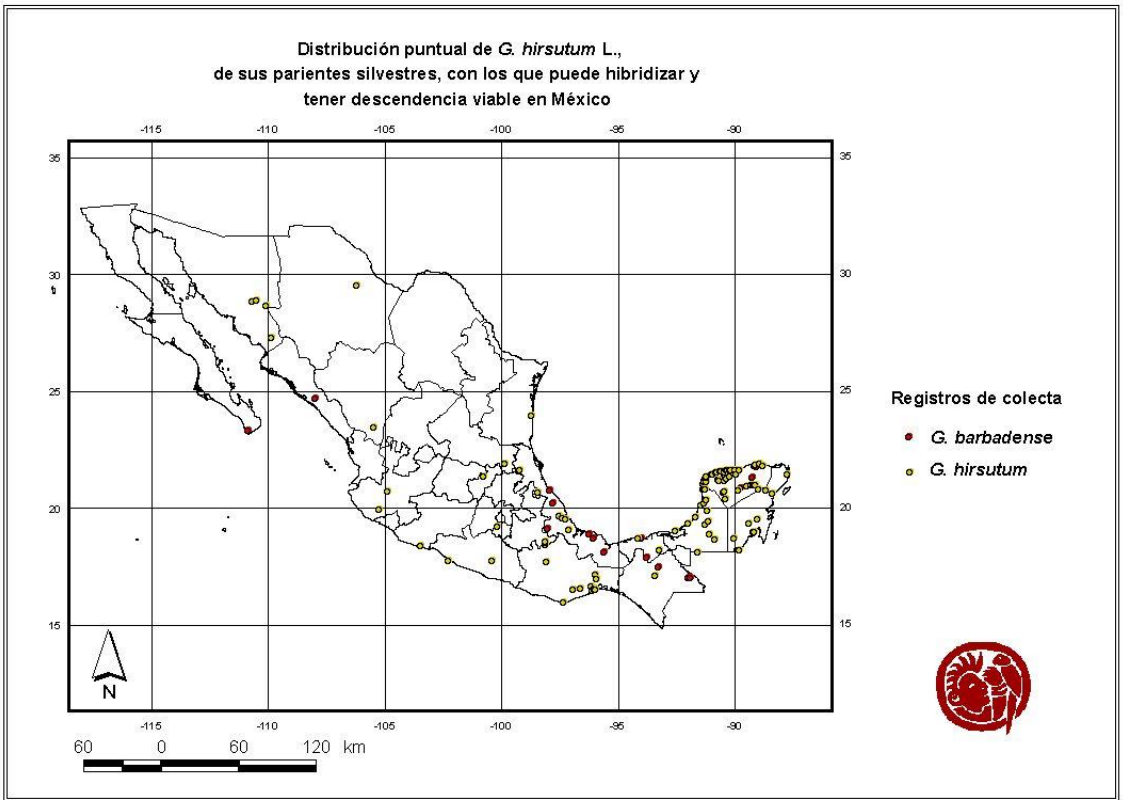


Figura 3. Distribución puntual de G*. hirsutum* L., de sus parientes silvestres, con los que puede hibridizar y tener descendencia viable en México.

d) Hábitats de persistencia o proliferación

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

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

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

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

Organismo receptor

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

Organismo donador

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

Para el evento TwinLink™

El evento TwinLink™ fue a su vez producido por medio del cruzamiento convencional de los eventos T304-40 (gen *cry1Ab*) y GHB119 (gen *cry2Ae*), cuyos genes fueron aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Ambos eventos, T304-40 y GHB119, contienen al gen *bar* como marcador de selección, el cual le confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio al organismo receptor y que fue aislado a partir del microorganismo *Streptomyces hygroscopicus*, cepa ATCC21705 (Murakami *et al*., 1986 (Anexo 2)).

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

Para los genes *cry1Ab* y *cry2Ae*

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

Para el gen *bar*

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

Para el evento GlyTol®

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Especies silvestres y distribución:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Columna estaminal larga.

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

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

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

d) Algodón silvestre, con n=26.

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

G. hirsutum, ha despertado gran interés en todo el mundo, teniéndose dentro de las variedades corrientes, una clasificación en 16 tipos: Deltapine, Fox, Stoneville (selección de Stoneville

Pedegreed Seed Company), Coker 100, Acala, Empire, FiberMax (selección de Bayer Bioscience Cotton Seed International), Rowden, Mebane Triumph, Western Mebane, Lankart, Paymaster, Macha, Hibred, Delfos, Uplands de largas fibras y Uplands diversas.

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

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

Para el evento TwinLink™

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

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

De la misma manera, la determinación de la secuencia completa del evento GHB119 muestra 358 bp de secuencia flanco 5', 4302 bp de la secuencia transgénica integrada y 320 bp de la secuencia flanco 3'. La secuencia detallada del evento GHB119, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización se muestran en Verhaeghe y Habex, 2008 (Anexo 4). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

Para el evento GlyTol®

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

primera reacción de PCR, un par de primers que amplifican las secuencias flanqueantes se usó para demostrar la naturaleza de la secuencia flanqueante. En una segunda reacción, se demostró la especificidad de los fragmentos de integración 5' y 3'. Los resultados obtenidos de los análisis PCR demostraron que las secuencias flanqueantes 5' y 3' del algodón GlyTol® son de origen de la planta del algodón (Habex y Lecleir, 2006 (Anexo 5)). *INFORMACION CONFIDENCIAL*

En Van der Klis *et al*., 2006 (Anexo 6) se presenta una caracterización detallada de la proteína 2mEPSPS y en Habex y Lecleir, 2006 (Anexo 5) y Habex, 2007 (Anexo 7) se detalla el locus transgénico. *INFORMACION CONFIDENCIAL*

i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros con demostración de resultados

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

TwinLink™

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

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

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 4. Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento T304-40

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

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 5. Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis Southern Blot del evento T304-40.

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

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 6. Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento GHB119

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

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 7. Resultados de las hibridaciones con las diferentes sondas en el análisis *Southern Blot* del evento GHB119

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

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

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

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

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

GlyTol®

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

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 8. Dibujo esquemático de la región del ADN-T en *Gossypium hirsutum* evento GlyTol® mostrando a estrategia de hibridación

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

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

Análisis Southern Blot para verificar el inserto en el algodón GlyTol

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 9. Resultados del análisis Southern Blot del algodón GlyTol® (T-DNA probe).

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

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

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

* ND = No Determinado; NA = No Aplicable

GLT: GlyTol® TwinLink™

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

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

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

Para demostrar la estabilidad estructural del algodón combinado GLT, se preparó ADN genómico de 24 plantas individuales. El ADN aislado fue digerido con *EcoRV*. Esta enzima reconoce únicamente las tres inserciones de ADN que contienen los genes *2mepsps*, *cry1Ab-bar* y *cry2Ae-bar*, respectivamente. *EcoRV* genera perfiles de restricción que son característicos para el ADN insertado en cada uno de los progenitores (T304-40, GHB119 y GlyTol®) y en el algodón GLT. La prueba de ADN de restricción de los progenitores y la cruza con las sondas de ADN marcado apropiadamente que consiste en todo o la mayoría del ADN-T de cualquiera de los genes: *2mepsps* o *cry1Ab-bar* o *cry2Ae-bar* reveló la hibridación esperada de los fragmentos de restricción en todas las muestras analizadas. En conjunto, estos datos demuestran la estabilidad de todas las inserciones de ADN en las plantas de algodón GLT cinco generaciones después de la cruza original.

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

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

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

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 10. Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *2mepsps* ADN-T

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 11. Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *cry1Ab-bar* ADN-T

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 12. Demostración de la estabilidad de GLT para la sonda del gene *cry1Ab*

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 13. Demostración de la estabilidad de GLT para el inserto *cry2Ae-bar* ADN-T

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

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

Para el evento TwinLink™

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

T304-40: pTDL008

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 14. Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008

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

Posición	Orientación	Origen de la secuencia
8767-8791		RB: Repetición del borde derecho del ADN-T de Agrobacterium tumefaciens (Zambryski, 1988 (Anexo 8))
8792-9728	Counter clockwise	**3´me1:** Contiene la región 3' no codificante del gen de la enzima NADP-malic de *Flaveria bidentis (*yellowtop) (Marshall *et al.,* 1996).
9729-11582	Counter clockwise	***Cry1Ab*:** Secuencia codificante del gen de la proteína Cry1Ab (MetAlaAsp2...Asp616) de *Bacillus thuringiensis berliner* 1715 (Höfte *et al*., 1986).
11583-11643	Counter clockwise	**5'e1:** Contiene la secuencia líder del gen E1 específico del tapetum (*GE1*). (Michiels *et al.,* 1992).
11644-12685	Counter clockwise	**Ps7s7:** Secuencia que incluye la región promotora duplicada derivada del segmento 7 del genoma del virus subterráneo del trébol (clover stunt) (Boevink et *al*., 1995)
12686-13543	Clockwise	**P35S3:** Secuencia que incluye la región promotora del trascripto 35S de CaMV (Odell *et al.,* 1985 (Anexo 9))
13544-14095	Clockwise	***bar*:** Secuencia codificante del gen fosfinotricin acetil transferasa de *Streptomyces hygroscopicus* descrito en Thompson *et al.* (1987) (Anexo 10)
14096-14393 1-12	Clockwise	**3´nos:** Secuencia que incluye la región 3' no codificante del gen nopalina sintetasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker *et al.*, 1982) (Anexo 11)
13-37		**LB:** Repetición del borde izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988) (Anexo 8)

GHB119: pTEM12

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 15. Representación esquemática de la estructura del plásmido pTDL008

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

Posición	Orientación	Origen de la secuencia
1-25		**LB:** Repetición del borde izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988 (Anexo 8))
26-335	Counter clockwise	**3'nos:** Secuencia que incluye la region 3' no codificante del gen nopalina sintetasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker *et al.*, 1982 (Anexo 11))
336-887	Counter clockwise	**bar:** Secuencia codificante del gen fosfinotricin acetyl transferasa de *Streptomyces hygroscopicus* descrito en Thompson *et al.* (1987) (Anexo 10)
888-1423	Counter clockwise	**Pcsvmv XYZ:** Secuencia que incluye la región promotora del virus en mosaico Cassava Vein (Verdaguer *et al.*, 1996)
1424-1920	Clockwise	**P35S2:** Secuencia que incluye la región promotora del trascripto 35S del virus mosaico de coliflor (Odell *et al.*, 1985 (Anexo 9))
1921-1990	Clockwise	**5'cab22L:** Incluye la secuencia líder del gen de la proteína de unión a clorofila a/b de *Petunia hybrida* (Harpster *et al.*, 1988)
1991-2155	Clockwise	**TPssuAt:** Secuencia codificante del péptido de tránsito del gen at1 sA de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis thaliana*, descrito en De Almeida *et al.* (1989)
2156-4051	Clockwise	***cry2Ae*:** Secuencia codificante de una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* adaptada al uso de codones de algodón
4052-4320	Clockwise	**3'35S:** Incluye la región 3' no codificante del trascripto 35S de CaMV (Sanfacon *et al.,* 1991)
4321-4345		**RB:** Repetición del borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens* (Zambryski, 1988 (Anexo 8))

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

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

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

[a] Probado por homocigocidad vía PCR

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

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

Para el evento GlyTol®

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

INFORMACION CONFIDENCIAL

Figura 16. Representación esquemática de la estructura del plásmido pTEM2

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

Elemento genético	Posición en el vector	Elementos genéticos y su función
LB	0001 - 0025	Borde izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988 (Anexo 8))
Ph4a748At	0025 - 1036	Secuencia que incluye la región del promotor del gen *histona H4* de *Arabidopsis thaliana* (Chaboute *et al*., 1987).
intron1 h3At	1037 - 1553	Secuencia que incluye el primer intron del gen II de la variante *histona H3.III* de *Arabidopsis thaliana* (Chaubet *et al*., 1992).
TPotp C	1554 - 1926	Péptido de tránsito optimizado como es descrito en Lebrun *et al.* (1996).
2mepsps	1927 - 3264	Secuencia codificante del gen *doble mutante 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintasa* del maíz (*Zea mays*) (Lebrun *et al*., 2003).
3'histonAt	3265 - 4007	Secuencia que incluye la región no-traducida 3' del gen *histona H4* de *Arabidopsis thaliana* (Chaboute *et al*., 1987).
RB	4008 - 4032	Borde derecho del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988 (Anexo 8))

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

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

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

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

S=susceptible; R=resistente.

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

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

k) Descripción del método de transformación.

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

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

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

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

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

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

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

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

Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ab

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

Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry2Ae

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

Secuencia de aminoácidos de la proteína PAT

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

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

Secuencia de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS

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

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

En el evento TwinLink™

Es sólo con la aplicación del herbicida glufosinato de amonio (GA), un potente inhibidor de la glutamino sintetasa (GS), una enzima que juega un papel esencial en la asimilación de amonio y en la regulación del metabolismo del nitrógeno en la planta (Bayer *et al*., 1972 (Anexo 12); Miflin *et al*., 1977 (Anexo 13); Sadaaki Mase, 1984 (Anexo 14); Murakami *et al*., 1986 (Anexo 2); Wild *et al*., 1987 (Anexo 15); Wendler and Wild, 1990 (Anexo 16)) que la expresión del transgen se ve involucrada en una ruta metabólica. El producto del gen *bar* metaboliza al GA a un derivado acetilado inactivo (De Block *et al*., 1987; Thompson *et al*., 1987 (Anexo 10)). Las plantas que no tienen el transgen pueden ser reconocidas y destruidas usando el herbicida en un estado temprano del desarrollo de la planta.

No se ha observado ningún efecto en otras rutas metabólicas tal como lo demuestran análisis de semilla y fibra de algodón TwinLink™ en cuanto a su composición. Basado en el análisis estadístico de la información analítica y en la evaluación del impacto nutricional de las diferentes evaluaciones, las semillas y la fibra del algodón TwinLink™ fueron encontradas como equivalentes en su composición y calidad nutricional con relación a sus contrapartes no modificadas. No existe impacto en el valor nutricional en la semilla de algodón debido a la transformación genética (Oberdörfer, 2008 (Anexo 17)).

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

En el evento GlyTol®

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

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

Evaluaciones del comportamiento del algodón GlyTol® efectuadas por Bayer en los Estados Unidos durante 2004-5 confirman que no hubo modificación en alguna ruta metabólica, ni impacto nutricional como resultado de la transformación genética, con la excepción de que el algodón que porta el gen *2mepsps* es insensible a la acción del herbicida glifosato (Oberdörfer, 2007 (Anexo 18)).

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

En el evento Twin Link™

El algodón TwinLink™ expresa las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT. Se evaluó de digestibilidad de la proteína Cry1Ab en ensayos con fluidos gástricos simulados (SGF), conteniendo pepsina y a pH 1.2 en tiempos de incubación de 0.5 a 60 minutos (Rouquié, 2007a (Anexo 19)). Las proteínas de referencia como Cry1Ab fueron incubadas con SGF humana, una solución de pepsina a pH 1.2, aproximadamente a 37°C. Las muestras fueron analizadas en busca de fragmentos de proteínas estables en los siguientes tiempos de incubación 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos utilizando SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie blue. Las proteínas de referencia Horseradish peroxidase (HRP), conocida por su digestión rápida, y ovalbumina (OVA), conocida por su digestión lenta, fueron evaluadas en paralelo.

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

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

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

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

Los parámetros de digestibilidad de la proteína Cry2Ae fueron evaluados en ensayos con SGF conteniendo pepsina y a pH 1.2 en tiempos de incubación de 0.5 a 60 minutos (Rouquié, 2008a (Anexo 21)). Las proteínas de referencia y Cry2Ae fueron incubadas con SGF humana y una solución de pepsina con pH 1.2 aproximadamente a 37°C. Las muestras fueron analizadas en busca de las proteínas de referencia y fragmentos estables de proteínas en los siguientes tiempos de incubación 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos utilizando SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie blue. Controles apropiados fueron utilizados, incluyendo la proteína Cry2Ae incubada con pH 1.2 sin pepsina, SGF sin Cry2Ae , y un loading control del 10% (dilución 1/10 de la proteína Cry2Ae para verificar la sensibilidad del procedimiento de tinción). Las proteínas de referencia Horseradish peroxidase (HRP), conocida por su digestión rápida, y ovalbumina (OVA), conocida por su digestión lenta, fueron evaluadas en paralelo.

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

La estabilidad de la proteína Cry2Ae fue analizada en SIF con pancreatina a pH 7.5 y tiempos de incubación entre 0.5 y 60 minutos (Rouquié, 2008b (Anexo 22)). Una solución conteniendo Cry2Ae fue incubada con SIF, una solución de pancreatina porcina a pH 7.5, aproximadamente a 37°C. Las muestras fueron analizadas en busca de fragmentos estables de proteínas o la proteína Cry2Ae intacta a tiempos de incubación 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos usando SDS-PAGE seguido de un western blot. Para la detección de la proteína Cry2Ae se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra Cry2Ae. Los controles apropiados incluyeron Cry2Ae en un buffer sin pancreatina, SIF sin la proteína Cry2Ae, y las condiciones de loading del 10% (para verificar la sensibilidad del procedimiento de detección).

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

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

Una batería de pruebas diseñadas para evaluar la proteína PAT en cuanto a características asociadas con alergenicidad y toxicidad no reportó problema alguno (Hérouet, 2004 (Anexo 23); Hérouet *et al*., 2005 (Anexo 24)). La proteína PAT no comparte una secuencia homóloga con alergenos conocidos ni toxinas y además no es estable en ambientes digestivos. Para completar la evaluación de toxicidad, se expuso a ratones a la proteína PAT vía intravenosa a una dosis de 10mg/Kg. peso corporal. Existe una considerable experiencia en la literatura científica donde se ha usado inyecciones vía intravenosa para evaluar la presencia de toxinas de alimentos o de bacterias. Además, cuando se compara con la ruta de exposición oral, solo se requiere una cantidad muy pequeña para demostrar una respuesta letal o no. Esta aproximación provee una exposición directa a la proteína PAT, que estará intacta dado que por esta vía se evita la degradación en el tracto digestivo. Por lo anterior, esta prueba es considerada la evaluación del peor caso comparada con otras rutas de exposición. Dado que la exposición por la ruta intravenosa de 10 mg/Kg. peso corporal no afectó el peso de los ratones ni manifestó algún signo de toxicidad, puede concluirse que existe una razonable certeza de la inexistencia de riesgo resultado de la inclusión de la proteína PAT en alimento humano o animal.

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

Estos estudios de digestión *in vitro* demuestran que la proteína PAT codificada por el gen *bar* posee una estabilidad estructural y funcional muy estrecha bajo condiciones intestinales y gástricas simuladas. Estos resultados confirman la inocuidad de la proteína PAT para consumo humano o

animal debido a que la rápida degradación de la proteína PAT minimiza grandemente la probabilidad de que esta proteína pueda sobrevivir en el tracto digestivo y sea por ello potencialmente absorbida facilitando una reacción tóxica o alergénica.

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

Más aún, un análisis del contenido de proteína PAT en los productos procesados derivados del algodón LL25® muestra que la cantidad de proteína PAT en productos de semilla decrece durante el procesamiento (Oberdörfer, 2003 (Anexo 25)); ver tabla inferior de este punto). Esto indica que la proteína PAT es degradada durante el proceso de extracción de aceite (altas temperaturas y disolvente). No se detecta proteína PAT en aceite crudo o refinado derivado de algodón LL25®.

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

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

En el evento GlyTol®

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

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

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

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

Otro aspecto importante de la proteína 2mEPSPS es que se degrada rápidamente y completamente en simulaciones de fluidos gástricos e intestinales humanos. Esto minimiza la probabilidad de que ésta proteína pudiera sobrevivir y ser absorbida en el tracto digestivo humano. En adición, no hubo mortalidad, signos clínicos, o efectos relacionados al tratamiento en ratones OF1 después de una administración oral aguda, vía tubo o jeringa, de la proteína 2mEPSPS a una concentración de 2, 000 mg de proteína por Kg. de peso corporal (Hérouet-Guicheney *et al*., 2009 (Anexo 26)).

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

En el evento TwinLink™

Las secuencias nucleótidos de los promotores y terminadores del evento T304-40 se muestran en Moens y De Pestel, 2008 (Anexo 3). Asimismo, las secuencias reguladoras presentes en el evento GHB119 se muestran en Verhaeghe y Habex, 2008 (Anexo 4). INFORMACION CONFIDENCIAL

La expresión del gen *cry1Ab* en el evento T-304-40 está regulada por el promotor *Ps7s7* del virus del mosaico del trébol, la secuencia líder *5'e1* y el terminador 3'me1 de *Flaveria hidentis*. La expresión del gen *bar*, utilizado como marcador de selección, está controlada por el promotor *P35S3* y el terminador *3'nos*.

Por su parte en el evento GHB119 la expresión del gen *cry2Ae* está dirigida por el promotor *P35S2*, la secuencia líder del gen *5'cab22L* de la petunia, el péptido de tránsito *TPssuAt* de Arabidopsis y el terminador *3'35S*. La expresión del gen *bar*, utilizado como marcador de selección, está controlada por el promotor *Pcsvmv XYZ* y el terminador *3'nos*.

Ninguna de las secuencias reguladoras pertenece a la especie receptora. Los datos obtenidos a partir de los estudios de Southern blot realizados con el evento de transformación T304-40 demuestran que se integró una copia casi completa del ADN-T dentro del genoma de la planta, flanqueada por una copia incompleta invertida del casete del gen *cry1Ab* y un terminador *3'me1* adicional. Para el evento GHB119, experimentos de hibridación por Southern Blot demostraron que solamente una copia del ADN-T fue integrada en el genoma *de Gossypium hirsutum* y que el ADN transferido a la planta mantiene la misma configuración original diseñada en el vector de transformación (Se detalla también en la sección I.h).

En el evento GlyTol®

Las secuencias reguladoras de la expresión del gen *2mepsps* se describen en Habex y Lecleir, 2006 (Anexo 5) y Habex, 2007 (Anexo 7). INFORMACION CONFIDENCIAL

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

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

De los organismos donadores:

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

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

Para los genes *cry1Ab* y *Cry2Ae*

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se encuentra mundialmente distribuida y que habita de manera natural en el suelo, granos, superficie de las hojas y agua. No solo se encuentra en varios ambientes naturales, sino también en muchos animales, incluyendo animales silvestres (por ejemplo ratón de campo, venados, roedores y mamíferos insectívoros) y probablemente en el hombre, así como también en los alimentos (por ejemplo pasta, pan y alimentos procesados que contienen harina) (OECD, 2007) (Anexo 27).

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

Para el gen *bar*

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

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

Para el gen *2mepsps*

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

Del organismo receptor:

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

El gosipol es una sustancia terpenoide encontrada naturalmente en muchas especies de *Gossypium* incluyendo al algodón y se encuentra localizada en glándulas a lo largo de toda la planta, incluyendo la semilla (Abou-Donia, 1989). Los aldehídos de terpenoides en las glándulas de pigmento son una fuente importante de resistencia a herbívoros e insectos. Los niveles de gosipol encontrados en alimentos humanos y animales fabricados a partir de semilla de algodón deben ser minimizados ya que pueden causar problemas toxicológicos como disminución del apetito, pérdida de peso corporal y disnea (Berardi y Goldblatt, 1980 (Anexo 28)). El gosipol se encuentra en estado libre en la semilla entera y se une a la lisina u otro componente durante su procesamiento en alimento. Se considera que el gosipol unido de esta manera no está disponible para los animales.

Los ácidos grasos ciclopropenoides (0.1 - 1.3% del aceite de semilla de algodón), estercúlico (C-19) y ácido malválico (C-18), son ácidos grasos únicos comunes en algodón. Los niveles de ácidos grasos ciclopropenoides deben ser también minimizados debido a sus efectos indeseables, los cuales dan como resultado alimentos inseguros (Cherry y Leffler, 1984 (Anexo 29); Phelps *et al*., 1965 (Anexo 30)).

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

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

r) Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotípo que confiere estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de estos genes

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

El glufosinato de amonio se define como un herbicida de contacto no selectivo. Después de la aplicación, el ingrediente activo fosfinotricin actúa a través de la hoja. No ha sido detectada acción en las raíces de las plantas después de la emergencia y no causa daño a plántulas antes de la emergencia. Rápidamente después de ser absorbido, el herbicida interviene en el metabolismo del amonio de las plantas tratadas. El transporte sistémico de las hojas tratadas a otras partes de la planta no está limitado (Wild and Manderscheid, 1984 (Anexo 31); Manderscheid and Wild, 1986

(Anexo 32); Wild *et al*., 1987 (Anexo 15); Bremmer *et al*., 1997 (Anexo 33); Wendler *et al*., 1990 (Anexo 16)).

El amoniaco es un importante eslabón entre los procesos catabólico y anabólico en el metabolismo de la planta y es liberado y reasimilado en grandes cantidades en diferentes procesos. Sin importar el origen, sin embargo, es esencial que el amonio sea convertido rápidamente a una forma no tóxica para el organismo (Wild and Manderscheid, 1984 (Anexo 31)). Esta reacción de desintoxicación es guiada por la enzima glutamino sintetasa (GS). Bajo condiciones normales, el amonio producido durante varios procesos metabólicos en la célula de la planta es principalmente enlazado con ácido glutámico para formar glutamina. Este proceso es catalizado por la enzima glutamino sintetasa (GS), una enzima clave del metabolismo del nitrógeno en plantas que puede desintoxicar el amonio en una forma suficiente (Wedler *et al*., 1976; Miflin *et al*., 1977 (Anexo 13); Keys *et al*., 1978 (Anexo 34); Wild and Manderscheid, 1984 (Anexo 31); Gebhardt *et al*., 1986; Wild *et al*., 1987 (Anexo 15); De Block *et al*., 1987).

El glufosinato de amonio inhibe la actividad de la enzima GS, de la cual al menos dos isoenzimas que difieren en su compartamentalización celular, pueden ocurrir en tejido verde de la hoja de plantas superiores (Miflin *et al*., 1977 (Anexo 13); Wild and Manderscheid, 1984 (Anexo 31); Ridley and McNally, 1985 (Anexo 35)). El herbicida activo, el compuesto PPT es un análogo del glutamato (Wendler *et al*., 1990 (Anexo 16)) y es un inhibidor específico de la enzima glutamino sintetasa (Wild and Manderscheid, 1984 (Anexo 31)). Parece que ejerce su efecto como un inhibidor competitivo de la glutamino sintetasa. Como resultado el metabolismo del amoniaco en la planta se ve afectado inmediatamente después de la aplicación del producto herbicida (Wild and Manderscheid, 1984 (Anexo 31); Manderscheid and Wild, 1986 (Anexo 32); Lindsey *et al*., 1989) y el amonio acumulado en el tejido vegetal (Wild *et al*., 1987 (Anexo 15)). Simultáneamente, la fotosíntesis es también severamente inhibida (Sauer *et al*., 1987 (Anexo 36); Wendler *et al*., 1990 (Anexo 16)).

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

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

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

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

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

t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados. 37

Algodón TwinLink™

Mertens and Moens, 2008 (Anexo 37) para el evento T304-40
Verhaeghe and Criel, 2008 (Anexo 38) para el evento GHB119

Evento GlyTol®

Habex, 2006 (Anexo 39)**.**

Evento GLT

Currier, 2009 (Anexo 40)**.**

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

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

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

b) Ubicación del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

En los tabla 10 y 11 se indican las coordenadas de los polígonos donde se efectuará la liberación del algodón GlyTol® TwinLink™ (Anexo 41).

Tabla 10. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Norte del estado de Tamaulipas.

Polígono Norte de Tamaulipas					
Vertice	**Latitud**	**Longitud**	**X**	**Y**	**Zona**
0	26.00278	-97.66805	633302.7554	2876671.072	14
1	25.77341	-97.37064	663387.8876	2851601.142	14
2	25.55966	-97.55446	645211.0716	2827710.876	14
3	25.42995	-97.7534	625359.0467	2813142.529	14
4	25.0398	-98.12578	588191.0594	2769639.526	14
5	25.04615	-98.94885	505159.6025	2770058.851	14
6	25.50283	-98.33928	566400.0908	2820792.122	14
7	25.49593	-98.55895	544326.1973	2819936.637	14
8	26.23106	-98.57656	542293.8799	2901341.749	14
9	26.04489	-98.19504	580529.517	2880903.517	14

Tabla 11. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Sur del estado de Tamaulipas.

Polígono Sur de Tamaulipas					
Vertice	**Latitud**	**Longitud**	**X**	**Y**	**Zona**
0	23.28916	-97.95692	606671.4554	2575914.197	14
1	22.89125	-97.77361	625789.5227	2532004.959	14
2	22.55768	-97.88394	614749.9577	2494985.181	14
3	22.24519	-97.81832	621769.4198	2460441.867	14
4	21.68185	-98.16706	586169.4442	2397844.299	14
5	21.93222	-98.84888	515606.1488	2425332.37	14
6	22.41509	-98.87124	513251.6981	2478778.437	14
7	22.43297	-99.11267	488405.7359	2480756.277	14
8	23.12597	-99.15291	484344.1159	2557472.912	14

En las Figuras 17 y 18 se pueden apreciar geográficamente los Polígonos propuestos para la liberación de algodón GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el estado de Tamaulipas en ambas regiones, los cuales se encuentran también en la carpeta de Anexos y Referencias de los dispositivos electrónicos (Anexo 42).

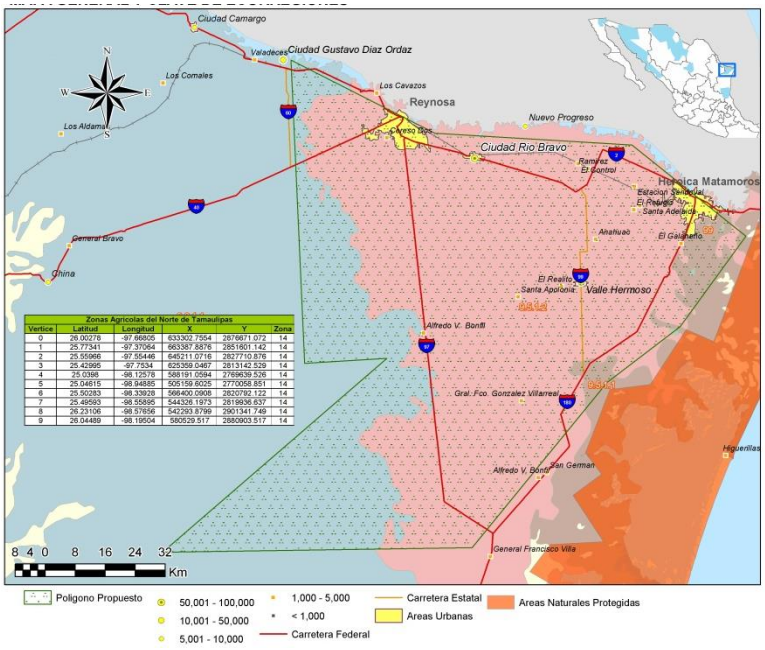


Figura 17. Polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Norte del estado de Tamaulipas.

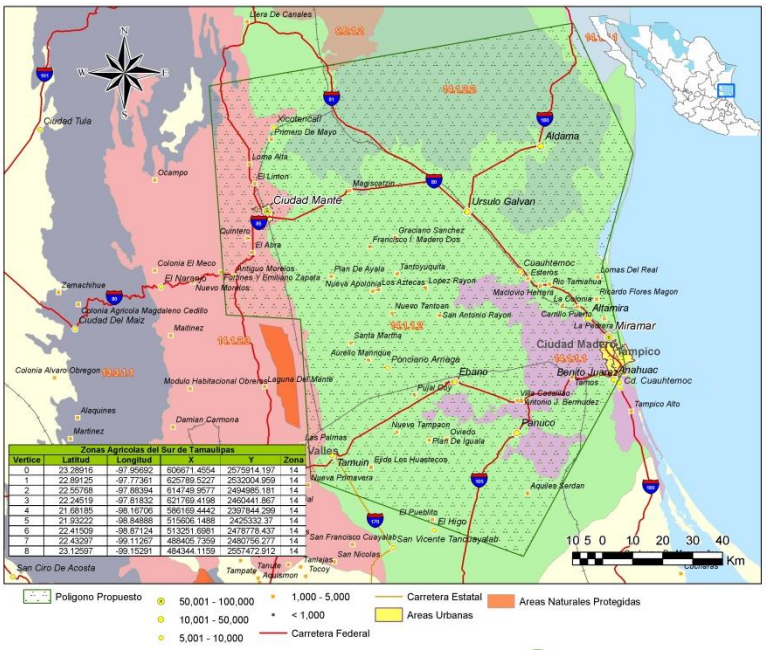


Figura 18. Polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ en etapa experimental en el Sur del estado de Tamaulipas.

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

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en la región agrícola del norte y sur del estado de Tamaulipas (Anexo 42).

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

De acuerdo a lo descrito por la CONABIO en 2011, no existen poblaciones silvestres cercanas al polígono de liberación del Norte del estado de Tamaulipas; se reporta una distancia del área de liberación al sitio de colecta del organismo receptor silvestre o parientes silvestres de 230 km. De igual manera, el riesgo por flujo génico es bajo, debido a que el polen es pesado y pegajoso, por lo que no puede ser transportado a largas distancias. Para el caso del polígono Sur de Tamaulipas, el sitio de colecta disponible más cercano del organismo receptor silvestre se encuentra a 142 (Figura 3).

2. Descripción geográfica.

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en las regiones algodoneras del norte del estado de Tamaulipas: Reynosa, Río Bravo, Valle Hermoso, Matamoros, Méndez, San Fernando y Burgos; Sur de Tamaulipas: Gómez Farías, Xicoténcatl, Llera, Aldama, González, El Mante, Ocampo, Altamira, Casas, Antiguo Morelos, Tampico, Ciudad Madero; Veracruz: Pánuco, Pueblo Viejo, Tampico Alto, Ozuluama de Mascareñas, Temporal, El higo; San Luis Potosí: Ébano, San Vicente Tancuayalab y Tamuín.

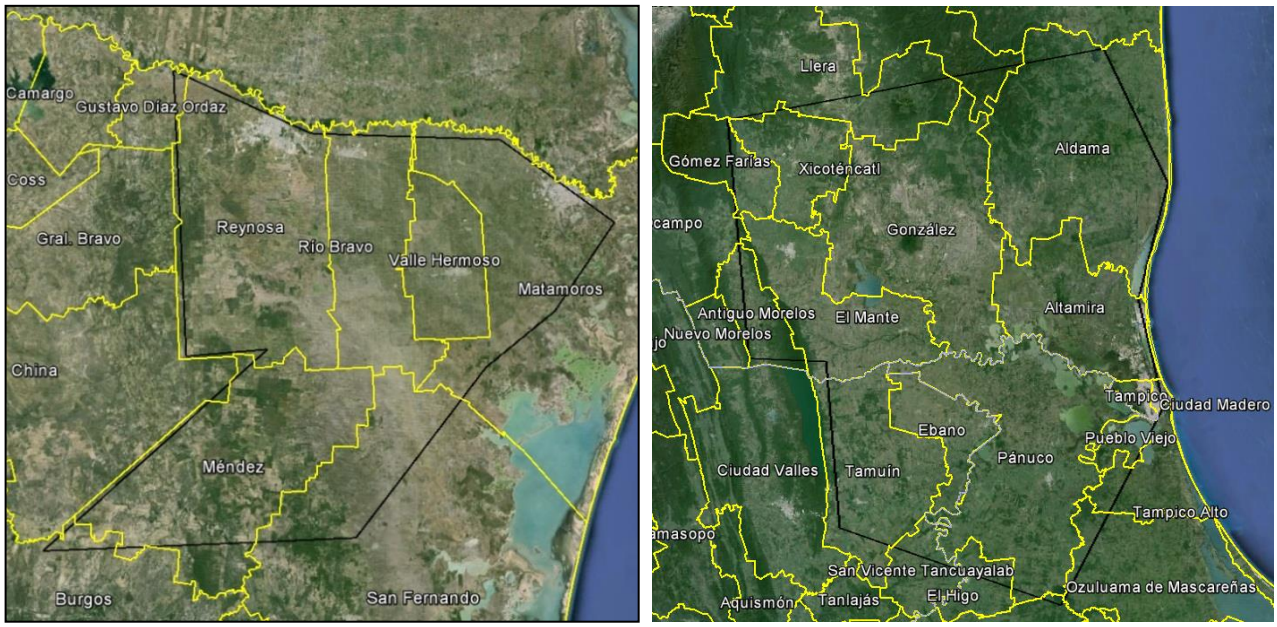


Figura 19. Municipios comprendidos dentro del polígono de liberación de algodón GLT del Norte y Sur del estado de Tamaulipas.

- **Áreas Naturales Protegidas**

La liberación del algodón GlyTol® TwinLink™ se hará exclusivamente dentro de los polígonos especificados en la solicitud, los cuales se encuentran a una distancia considerable de las Áreas Naturales Protegidas: **Laguna Madre, Delta del Río Bravo, Santuario Playa de Rancho Nuevo y Reserva de la Biosfera Sierra del Abra Tanchipa**; no obstante y con fundamento en lo establecido en el Artículo 89 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y los artículos 48 y 49 de la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al

Ambiente, Bayer de México, S.A. de C.V. se compromete a establecer los controles y cumplir con las medidas de bioseguridad necesarias para que la liberación del algodón genéticamente modificado GlyTol® TwinLink™ no se realice en las zonas núcleo y a menos de un kilómetros de las ANP´s anteriormente mencionadas.

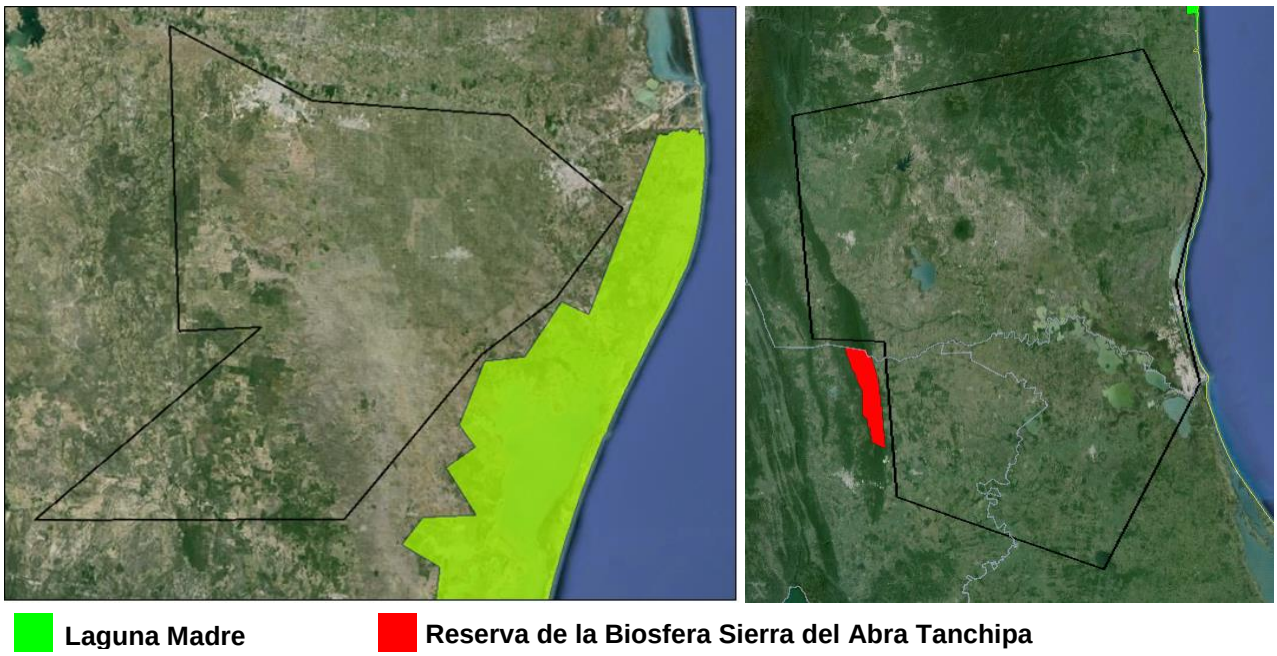


Figura 20. Áreas Naturales Protegidas cercanas al polígono de liberación del Norte y Sur del estado de Tamaulipas.

En los mapas de los polígonos de liberación propuestos para el Norte de Tamaulipas (Anexo 42a) y Sur de Tamaulipas (Anexo 42b), se resaltan las Áreas Naturales Protegidas cercanas.

- **Sitios Ramsar**

Dentro del polígono de liberación del estado de Tamaulipas, no existen zonas de traslape con los sitios Ramsar: **Sitio Ramsar No. 1326 - Playa Tortuguera Rancho Nuevo** y **Sitio Ramsar No. 1362 - Área de Protección de Flora y Fauna Laguna Madre** (Figura 21); que son los únicos sitios con estas características cercanos al sitio de liberación.

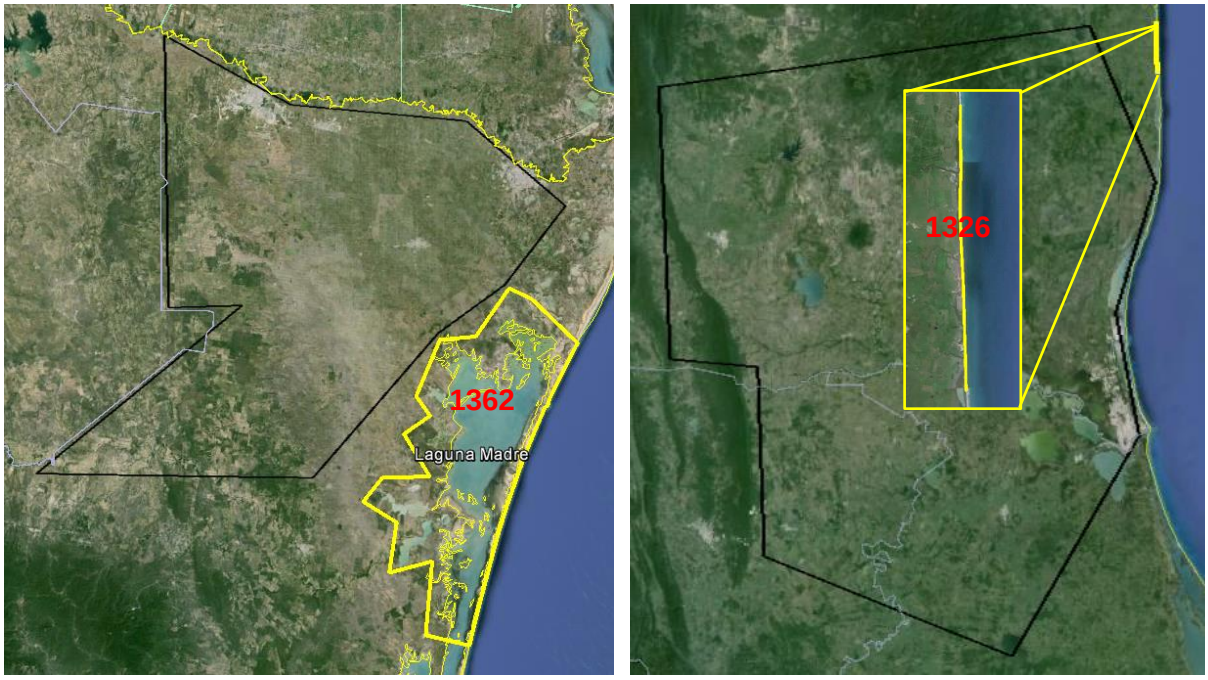


Figura 21. Sitios Ramsar que se traslapan con el polígono del Norte y Sur del estado de Tamaulipas.

Tabla 12. Superficie de sitios Ramsar cercanos a los polígonos propuestos de liberación.

Nombre del Área Natural	Modalidad de conservación	Fecha de decreto	Municipio (s) y Estados de traslape	Superficie de traslape (ha)
Playa Tortuguera Rancho Nuevo	Sitio Ramsar	27-Nov-03	Villa de Aldama	30
Área de Protección de Flora y Fauna Laguna Madre	Sitio Ramsar	02-Feb-04	Matamoros, San Fernando, Soto la Marina	307,894.156
Total				**307,924.156**

3. Plano de ubicación señalando vías de comunicación.

En la Carpeta de anexos y Referencias contenida en los dispositivos electrónicos que acompañan esta solicitud (Anexo 42), se presentan los polígonos propuestos para la liberación. En los mapas principales de dicho anexo, se pueden observar en líneas rojas y naranjas que corresponden a las principales carreteras federales y estatales. Adicionalmente en el mapa de carreteras y caminos de la SCT de los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango y Tamaulipas, se puede observar con mayor detalle las principales vías de comunicación en las áreas de liberación propuesta (Anexo 43).

III. Estudio de los posibles riesgos que la liberación de los OGM pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica

a) Estabilidad de la modificación genética del OGM.

La estabilidad del inserto en los eventos GlyTol® y TwinLink™ fue demostrada por medio de segregación Mendeliana (como se discute en la sección I.j), así como también por medio de análisis Southern blot.

La estabilidad del inserto fue demostrada en múltiples generaciones en los eventos progenitores del algodón TwinLink™ y del algodón GlyTol®, tal como se mencionó en el inciso I.s.

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

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

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

Tabla 13. Contenido de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y PAT en varios tejidos de los algodones T304-40, GHB119 y TwinLink™. El contenido de las proteínas es expresado en µg/g peso fresco

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

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

Tabla 14. Niveles de la proteína 2mEPSPS en tejidos de la planta del algodón GlyTol®

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

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

c) Características del fenotipo del OGM.

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

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.

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

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

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

Tabla 15. Hábito de crecimiento y morfología de la planta en varias regiones de los EE UU. Comportamiento del algodón TwinLink™ y la variedad Coker, con aplicación y sin la aplicación del herbicida glufosinato de amonio (GA)

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

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

Tabla 16. Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2004

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

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

Tabla17. Datos de hábito de crecimiento y fenotipo del algodón GlyTol® en varias regiones en 2005

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

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

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

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

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

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

El algodón GLT expresa las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, PAT y 2MEPSPS. Existen tiras reactivas Envirologix (QuickStix® Strips) en muestras de hojas. La utilización de tiras reactivas permite, al igual que en el caso de otros cultivos GM, identificar de forma rápida y confiable al algodón GlyTol® TwinLink™. El método identifica en forma específica las proteínas Cry1A & Cry2Ae & 2mEPSPS & PAT/BAR (Anexo 49).

- ✓ EnviroLogix. QuickStix™ Combo Comb Kit for Multi-Trait Testing *Cry1A/2Ae/2m/bar* Cotton Seed
- ✓ Catalog Number: AS 025 ST.

Este método está disponible públicamente y puede ser consultado en la siguiente dirección: http://www.envirologix.com/wp-content/uploads/2015/05/AS025-ST-MultiTrait-Quad-C1C2Ae2mLL-051412.pdf

A nivel molecular se puede hacer una detección por medio de PCR, en la sección de caracterización molecular se proveen las referencias en las que se encuentran los *primers* específicos para efectuar la reacción.

Los Métodos de detección para los eventos GlyTol® (GHB614) (Anexo 44), T304-40 (Anexo 45) y Liberty Link (GHB119) (Anexo 46) se incluyen en la Carpeta de Anexos y Referencias. *INFORMACIÓN CONFIDENCIAL*

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

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

i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.

Van Deynze *et al*., 2005 (Anexo 47)**.**

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

a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad:

1. Plan de monitoreo detallado.

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

- ⇨ Efectuar una localización georreferenciada de los lotes de los agricultores cooperantes que siembren el algodón GLT con el propósito de tener un control sobre los sitios de liberación y de esa manera evitar que se siembre en predios no autorizados. En este caso cabe la posibilidad que la liberación se efectúe al interior de un campo experimental de una institución reconocida.
- ⇨ Auditorías internas por parte de Bayer para vigilar el cumplimiento de las Medidas de Bioseguridad y condicionantes.
- ⇨ Realizar una capacitación a todo el personal involucrado en el proceso de producción con el objeto de que toda persona relacionada con el cultivo conozca las posibles implicaciones, riesgos y beneficios de uso y manejo del algodón GLT.

El plan de capacitación incluye:

Grupo a capacitar	Responsable de la capacitación	Fecha de la capacitación
Investigadores responsables	Personal de Asuntos Regulatorios y/o Representantes de Desarrollo Comercial de Bayer CropScience BioScience	3ª y 4ª semana de Noviembre 2016
Personal asistente de los investigadores	Investigadores responsables y/o Personal de Asuntos Regulatorios y/o Representantes de Desarrollo Comercial de Bayer CropScience BioScience	3ª y 4ª semana de Noviembre 2016
Técnicos locales	Personal de Asuntos Regulatorios y Representantes de Desarrollo Comercial de Bayer CropScience BioScience,	3ª y 4ª semana de Noviembre 2016
Agricultores cooperantes	Personal de Asuntos Regulatorios y Representantes de Desarrollo Comercial de Bayer CropScience BioScience,	3ª y 4ª semana de Noviembre 2016

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

En el Anexo 48 se presenta el material relativo al programa de capacitación, enfocado a: Bioseguridad de organismos genéticamente modificados, manejo de resistencia de insectos, responsabilidades individuales de los involucrados en la liberación, ecorregiones y Áreas Naturales Protegidas.

2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM.

El programa de monitoreo se realizará posterior a la cosecha en las zonas donde se siembre el algodón genéticamente modificado, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento GlyTol® TwinLink™ y procediendo a su destrucción. Se implementarán las siguientes medidas:

- ⇨ Se deberá llevar a cabo un monitoreo de voluntarias de todos los predios regulados con el fin de prevenir la presencia en el medio ambiente de un material regulado. Las voluntarias descubiertas deben ser destruidas y documentadas.
- ⇨ En las zonas donde fueron sembradas las variedades con el evento GLT deberá hacerse monitoreos de voluntarias un ciclo agrícola después del término del ensayo experimental de algodón.
- ⇨ Los monitoreos empezarán después del término del ensayo experimental de algodón, cuando se observan plantas voluntarias éstas deberán ser destruidas antes de que floreen, por medios de control químico o de manera manual.

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

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

El algodón GLT expresa las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, PAT y 2MEPSPS. Existen tiras reactivas Envirologix (QuickStix® Strips) en muestras de hojas. La utilización de tiras reactivas permite, al igual que en el caso de otros cultivos GM, identificar de forma rápida y confiable al algodón GlyTol® TwinLink™. El método identifica en forma específica las proteínas Cry1A & Cry2Ae & 2mEPSPS & PAT/BAR (Anexo 49).

- ✓ EnviroLogix. QuickStix™ Combo Comb Kit for Multi-Trait Testing *Cry1A/2Ae/2m/bar* Cotton Seed
- ✓ Catalog Number: AS 025 ST.

Este método está disponible públicamente y puede ser consultado en la siguiente dirección: http://www.envirologix.com/wp-content/uploads/2015/05/AS025-ST-MultiTrait-Quad-C1C2Ae2mLL-051412.pdf

A nivel molecular se puede hacer una detección por medio de PCR, en la sección de caracterización molecular se proveen las referencias en las que se encuentran los *primers* específicos para efectuar la reacción.

Los Métodos de detección para los eventos GlyTol® (GHB614) (Anexo 44), T304-40 (Anexo 45) y Liberty Link (GHB119) (Anexo 46) se incluyen en la Carpeta de Anexos y Referencias. *INFORMACIÓN CONFIDENCIAL*

b) Medidas y procedimientos de bioseguridad.

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

Si ocurriese una liberación accidental durante el transporte de la semilla, se procederá a la limpieza de todos los materiales involucrados y al aviso de dicha situación al personal de Bayer de México S.A. de C.V. Asimismo, de acuerdo a lo establecido en el Artículo 59 del Reglamento de la LBOGM, se notificará al correo libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx, dentro de las 24 horas siguientes que se tenga conocimiento de la liberación y se informará de manera oficial en un máximo de 3 días hábiles a la ventanilla de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP).

Como se menciona en el plan de monitoreo, se mantendrá un control de los predios por medio de su ubicación georreferenciada y de esta manera evitar que se siembre algodón GLT fuera de los predios autorizados.

Deberá efectuarse una revisión y limpieza de la maquinaria e implementos utilizados durante la siembra que pudieran contener semilla. El algodón es una planta que no se reproduce vegetativamente cuando crece en el campo, de tal manera que la única forma de que el algodón transgénico sobreviva es mediante la diseminación por semilla.

El manejo en campo del algodón GLT será siempre realizado por personal capacitado y experimentado en el manejo de este tipo de material. El acceso a los lotes donde se sembrará el algodón GLT estará restringido solo a personal autorizado por la compañía para tal fin y personal del investigador responsable.

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

Las siguientes medidas serán implementadas:

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

- ✓ Limpiar la maquinaria e implementos que pudieran contener semilla utilizados durante la siembra del cultivo, después de efectuar los trabajos correspondientes. El algodón es una planta que no se reproduce vegetativamente cuando crece en el campo, de tal manera que la única forma de que el algodón transgénico sobreviva es mediante la diseminación por semilla.

- ✓ Realizar un programa de monitoreo de voluntarias en las áreas donde se siembre el algodón biotecnológico, dirigiendo la búsqueda a plantas de algodón voluntarias que puedan expresar el evento GLT y procediendo a su destrucción por medios químicos o manuales.

- ✓ Si bien el polen de algodón es muy pesado y pegajoso y no es transportado por el viento, los lotes de ensayo se ubican en áreas que cuentan con barreras físicas naturales provistas por la vegetación circundante. Estas barreras sirven de freno a cualquier movimiento poco probable de bellotas abiertas causadas por el viento.

El acceso a los lotes donde se siembra material regulado estará restringido solo a personal autorizado por la compañía para tal fin y personal del agricultor cooperante. En el caso de que personas no autorizadas ingresen a la zona de liberación, el agricultor cooperante notificará el hecho a Bayer de México S.A. de C.V., quien a su vez dará aviso a la ventanilla de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP).

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

Las medidas y procedimientos de bioseguridad están diseñados para evitar cualquier contingencia, de tal forma que existe un riesgo bajo de que cualquier evento de este tipo pueda ocurrir, sin embargo, en caso de identificar, como resultado de un monitoreo aleatorio de las zonas algodoneras, predios sembrados con algodón GLT, se procederá a la integración de un registro de quien o quienes hayan procedido fuera de la ley y se actuará de acuerdo a los procedimientos legales que corresponden. El hecho se informará a la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP).

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

La zona donde se pretende liberar el algodón GLT está bien caracterizada. Existe el compromiso de Bayer de México S.A. de C.V. de liberar el algodón GLT sólo dentro del polígono de liberación propuesto en esta solicitud. Lo anterior se mantendrá controlado con la ubicación de las coordenadas GPS del experimento. Por tratarse de un experimento confinado, se sembrará una franja perimetral con algodón convencional alrededor de la superficie sembrada con el algodón GM (Anexo A), como medida de contención. Además, se informará de dicha liberación a los agricultores vecinos de los predios en los que se sembrará el algodón GLT. Lo anterior tendiente a mantener claramente definidos los sitios de liberación.

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

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

Además de que el evento genético combinado GLT: GlyTol® TwinLinkTM (GHB614 x T304-40 x GHB119) cuenta con la formal autorización No. 123300913X0001 de fecha 14 de septiembre de 2012 (Anexo 50), expedida por la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

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

Las platas de algodón GLT serán destruidas en campo una vez realizadas la cosecha y las evaluaciones correspondientes. Así mismo, la semilla obtenida después del despepite será destruida evitando su liberación al ambiente o su ingreso a la cadena de comercialización

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

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

El algodón que porta genes de resistencia a insectos ha sido aprobado comercialmente en varios países y ha sido liberado de manera experimental en México bajo los nombres de Bollgard® y Bollgard II®. Los progenitores que originaron al algodón TwinLink™ y el mismo algodón TwinLink™ han sido liberados en los Estados Unidos y ya se ha obtenido su desregulación. El algodón TwinLink™ también expresa la proteína PAT, componente central del algodón Liberty Link®, tolerante al herbicida glufosinato de amonio, el cual ha sido aprobado y liberado en varios países:

- ☑ En USA, the Animal and Plant Health Inspection Service (US Department of Agriculture) aprobó la siembra comercial, y la Food and Drug Administration aprobó para consumo humano y animal en 2003, se anexan los documentos de aprobación en la carpeta de referencias (**USDA notification and FDA notification** (Anexo 50c y 50d)). También pueden consultarse directamente en la página Web de dichas oficinas de gobierno de USA.
- ☑ En Korea se aprobó la liberación comercial del algodón Liberty Link® y para consumo humano en 2005

- ☑ En Japón también ha sido aprobado para liberación comercial y para consumo humano y animal– the Japanese Ministries of Agriculture, Forestry and Fisheries 2006, y Health, Labour and Welfare - a principios de 2006.
- ☑ En Australia, la liberación comercial del algodón Liberty Link® fue aprobada en 2006 por "The Office of the Gene Technology Regulator, Australia".
- ☑ El algodón GlyTol® también ha sido liberado experimentalmente en los Estados Unidos de América y ha sido desregulado recientemente (Se anexa copia de la notificación del USDA en la carpeta de referencias con el nombre de **USDA notification_GlyTol (GHB614).** (Anexo 50e)).

El país de origen del algodón GlyTol® TwinLink™ (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8) es los Estados Unidos de América y cuenta con autorización para su comercialización bajo es estatus de no-regulado desde el 30 de abril de 2009 para el evento BCS-GHØØ2-5, y del 23 de septiembre de 2011 para los eventos combinados (BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8).

Tabla 18. Estatus Regulatorio del algodón TwinLink™ en otros países[1] (Anexo 50)

País	Autoridad	Estatus
Estados Unidos (Anexo 50d)	Food and Drug Administration	Evaluación de riesgos terminada: Autorizado
Canadá (Anexo 50f)	Canadian Food Inspection Agency	Evaluación de riesgos terminada: Autorizado

En Estados Unidos las principales áreas de liberación de algodón biotecnológico están ubicadas en la denominada franja algodonera, la cual comprende cuatro grandes regiones: sureste, oeste medio, suroeste y oeste. El ambiente a través de estas regiones es muy diverso, desde la costa húmeda del sureste hasta el desierto del suroeste y oeste (Zeng *et al.*, 2014 Anexo 51), sin embargo, debido a los requerimientos ambientales del algodón, una de las principales características de esta franja es que la temperatura media en verano es mayor de 25 °C y la precipitación media anual fluctúa entre 500 y 1,270 mm, asimismo, en las regiones productores de algodón más importantes, los meses que coinciden con la etapa de madurez y cosecha son relativamente secos lo que previene el daño a la fibra. Las épocas de siembra y cosecha también

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

son diversas, con un periodo de siembra que comprende desde marzo a junio y un periodo de cosecha entre agosto y diciembre (USDA-Economic Research Service http://www.ers.usda.gov/topics/crops/cotton-wool/background.aspx).

Las variedades de algodón modificadas genéticamente que expresan diferentes características de resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas, se siembran a lo largo de toda la franja algodonera de Estados Unidos desde 1996. Actualmente, el algodón biotecnológico representa alrededor del 81% del total de la superficie destinada al cultivo del algodón en ese país (tabla 19).

Tabla 19. Superficie sembrada con algodón en Estados Unidos 2013 – 2014.

Región	Superficie total (ha)	Superficie algodón biotecnológico (ha)	Algodón biotecnológico (%)
Sureste (AL, GA, NC, SC, VA, FL)	1,073,631.0	958,573.3	89.3
Oeste medio (MS, LA, MO, AR, TN)	499,786.8	444,891.6	89.0
Suroeste (TX, OK, KS)	2,412,735.8	1,442,619.1	59.8
Oeste (CA, NM, AZ)	115,740.1	101,964.9	88.1
Total	**4,101,893.6**	**2,948,048.9**	**81.5**

Fuente: National Cotton Council of America (http://www.cotton.org/econ/cropinfo/varieties/southwest.cfm)

Los principales tipos climáticos que atraviesan la franja algodonera son clima húmedo subtropical (Cfa), clima semiárido (BSk) y clima desértico (BWh) (figura 22).

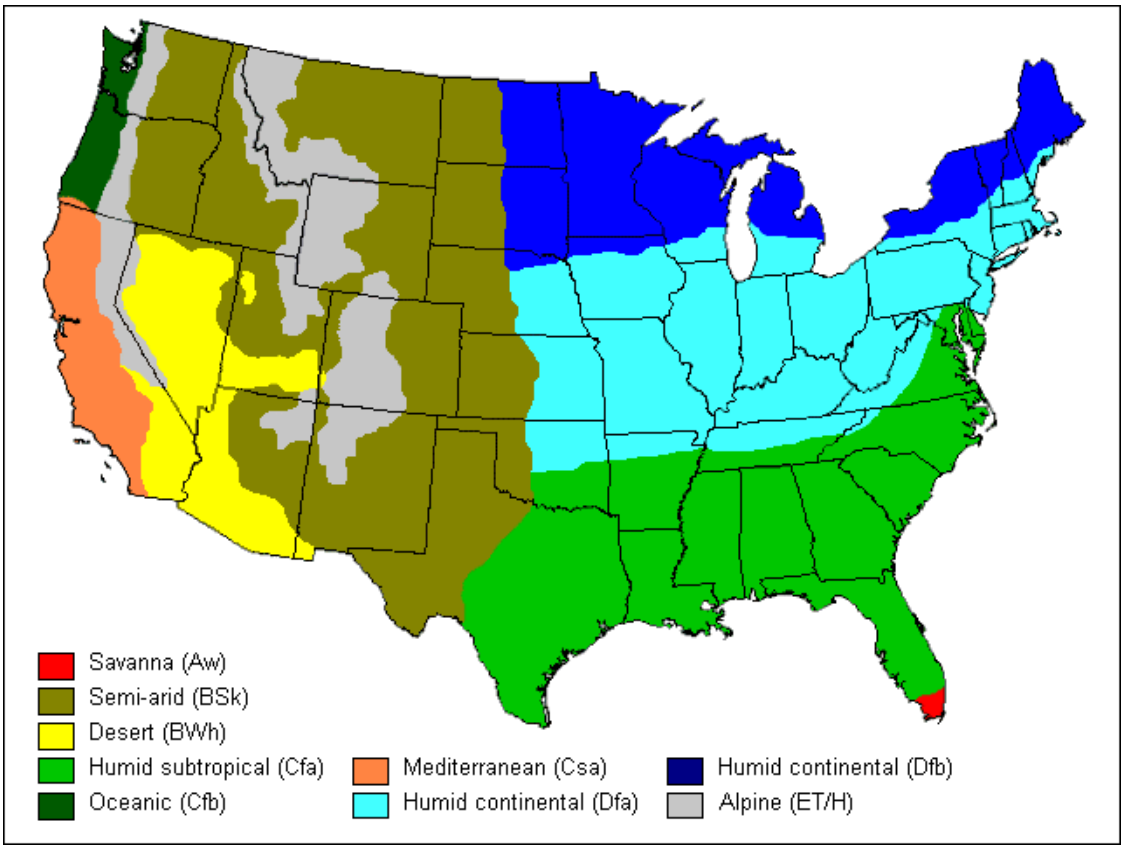


Figura 22. Principales tipos climáticos de Estados Unidos.

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

El algodón GlyTol® TwinLink™ (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8) tiene únicamente dos ventajas competitivas en relación al algodón convencional, debido a su tolerancia a las aplicaciones de los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato y su capacidad de resistir el ataque de insectos lepidópteros. De acuerdo con la regulación vigente aplicable al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), los eventos se autorizan por separado, por esa razón los documentos referenciado son para el evento GlyTol® (Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol® cotton Event GHB614; OECD Unique Identifier BCS-GHØØ2-5, Anexo 52) y para el evento TwinLink™ (Petition for Determination of Nonregulated Status for Insect-Resistant and Glufosinate Ammonium-Tolerant cotton: TwinLink™ cotton (events T304-40 x GHB119); OECD Unique Identifier BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8,

Anexo 53), de esta manera los resultados de los efectos sobre flora y fauna se presentan por separado.

Tecnología GlyTol® (BCS-GHØØ2-5)

El potencial de cruzamiento se puede definir como la capacidad de escape de genes a parientes silvestres de algodón. Anteriormente, el USDA indica en el documento de evaluación ambiental de algodón Round Up Ready® que "la posibilidad de que la introgresión de genes a partir de líneas de algodón transgénico en plantas sexualmente compatibles silvestres o cultivadas es muy bajo" (USDA 1995). En EE. UU. sólo están presentes dos especies de *Gossypium* silvestre: *G. thurberi Todaro* se encuentra en la región de montaña en Arizona a altitudes de 760 a 1,500 m y *G. tomentosum* que se encuentra en Hawái. De estos grupos sólo *G. tomentosum* es capaz de cruzarse con algodón convencional y que podría producir descendencia fértil. No existe ninguna ventaja conferida por el evento GlyTol® que permita que esta cruza ocurra. *Gossypium hirsutum* es considerado un cultivo de autopolinización. El polen de algodón es pesado y pegajoso por lo que la polinización cruzada por el viento es poco probable. Sin embargo, puede ser polinizado por insectos donde las abejas (*Apis mellifera*) y abejorros (*Bombus spp*.) son los polinizadores primarios. El movimiento del polen fue rastreado por medio de partículas fluorescentes. McGregor (Anexo 54) logro encontrar en 45 a 60 m de distancia de la planta de origen, sólo el 1.6 por ciento mostró la presencia de las partículas fluorescentes. Otros grupos de investigación han establecido distancias más pequeñas para que pueda ocurrir polinización cruzada (Kareiva *et al.* 1994 Anexo 55; Sundstrom, 2001 Anexo 56; Van Deynze *et al*. 2005 Anexo 47).

El algodón (*G. hirsutum*) no es considerado una maleza y no tiene parientes silvestres sexualmente compatibles excepto quizás *G. tomentosum* en Hawai, el USDA ha determinado que "el algodón no es considerado como maleza en USA" (USDA, 1995). Resultados anteriores de la USDA durante la evaluación ambiental de algodón tolerante a herbicidas no muestran ningún cambio en el potencial de convertirse en maleza. La mayor preocupación es la de plantas voluntarias que podrían convertirse en maleza en los años siguientes. Las plantas voluntarias también están limitadas por la geografía en los que pueden existir ya que el algodón no sobrevive como una planta perenne, por las temperaturas de congelación durante el invierno. Las plantas voluntarias pueden ser fácilmente controladas por la rotación de cultivos, la labranza y/o control manual post-emergencia.

Por otro lado, un análisis de la composición de las plantas que contienen proteína 2mEPSPS indica que no hay cambios significativos en el contenido de gosipol de las plantas o niveles de anti nutrientes entre algodón GlyTol® evento GHB614 y la contraparte convencional. Esto indica que el algodón biotecnológico no es más tóxico que su contraparte convencional. Asimismo, las observaciones en campo indican que no han existido cambios en las poblaciones de aves, polinizadores y otras especies de vida silvestre. El algodón tolerante a herbicidas ha hecho más viables prácticas de siembra como labranza de conservación, lo que resulta en un "agro-ecosistema" menos perturbado, debido a la reducción de labores de mantenimiento del cultivo. l Un mejor desarrollo cultivo del algodón también contribuye a mejorar el hábitat para los pájaros, los insectos y otros animales que se desarrollan en el (Fawcett y Towery, 2004 Anexo 57). En resumen, la adopción de prácticas de mínima labranza o labranza de conservación, contribuyen a reducir la erosión del suelo, el consumo de combustible y otros insumos, y tiene un impacto positivo directo en el bienestar de las especies que se encuentran en entornos agrícolas.

Debido a que la proteína 2mEPSPS está contenida dentro de la planta, el potencial para la exposición a la proteína se limita a la alimentación directa del algodón GlyTol®. La exposición del suelo no es una preocupación ya que la producción de proteínas termina con la senescencia de la planta, y es muy probable que hay ocurrido una degradación significativa de las proteínas en el momento en el material de algodón residual se incorpora en el suelo al final de la temporada. Pruebas de toxicidad oral aguda de la proteína se describe en Rouquie (2006, Anexo 58), y la proteína 2mEPSPS no se considera que sea tóxico para mamíferos, aves o insectos. Además, la exposición a polen de algodón que contiene la proteína 2mEPSPS no es una preocupación para los organismos no blanco, debido a la baja expresión de la proteína en el polen de algodón y al hecho de que no se observaron efectos en un estudio de toxicidad aguda en niveles muy altos de la proteína (2,000 mg de proteína/kg de peso corporal).

En cuanto a la toxicidad del algodón GyTol® para las aves y mamíferos no se detectaron cambios significativos en el contenido de gosipol y antinutrientes en los niveles generales de la planta, por tal razón no se prevé que el evento de algodón GlyTol® GHB614 tiene un mayor grado de riesgo que el algodón convencional. Para los organismos polinizadores no se encontraron diferencias significativas entre el algodón transgénico y el algodón no transgénico en la morfología de la flor o el tiempo para florecer. Además, la proteína 2mEPSPS se expresa a un nivel muy bajo en el polen de algodón y debido a que no se encontraron otros cambios en el patrón de floración o la toxicidad

de la planta, no se prevé que las especies polinizadoras, principalmente insectos, se verían afectados por el algodón GlyTol®.

Los organismos foliares benéficos no se ven afectados ya que no se encontraron diferencias significativas en el desarrollo o en la morfología entre el transgénico y líneas de algodón convencional. La reducción en la perturbación del ecosistema en el campo algodonero en realidad puede aumentar el suministro de hábitat y alimento para los insectos benéficos.

Tecnología TwinLink™ (BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8).

Los insectos son los organismos con mayor posibilidad de tener una exposición significativa al algodón Twinlink™, ya sea por alimentación directa sobre las plantas o polen, o al alimentarse de otros insectos que se han alimentado de las plantas de algodón. Las proteínas Cry se han estudiado ampliamente durante muchos años en muchas especies de insectos. Datos adicionales fueron generados por Bayer CropScience sobre los efectos de Cry1Ab, Cry2Ae en insectos blanco y en especies representativas de los insectos que se encuentran en las plantas de algodón. No se observaron efectos sobre insectos predadores *Coleomegilla maculata* (mariquita), o en la abeja de la miel, que podría estar expuesta al polen de plantas con el evento TwinLink™.

También existe la posibilidad de exposición a los organismos del suelo y a material vegetal. Esta exposición es muy limitada, ya que las proteínas Cry tienen una vida media muy corta en el suelo. La vida media para ambas proteínas (Cry1Ab y Cry2Ae) se determinó en los suelos típicos de las regiones productoras de algodón, dando como resultado que la vida media promedio fue de aproximadamente tres días para ambas proteínas. Además, ambas proteínas fueron probadas contra los colémbolos, *Folsomia candida*, ya que juegan un papel importante en la descomposición de material vegetal en el suelo. Ninguna proteína tuvo un efecto significativo sobre esta especie a concentraciones ambientales relevantes. Un estudio adicional utilizando hojas de algodón TwinLink™ no mostró ningún efecto significativo. Datos previamente generados indican que Cry1Ab presenta un riesgo mínimo para lombriz de tierra, y los datos de Cry2Ae generados por Bayer CropScience confirman que también presenta un riesgo mínimo para esta misma especie.

La exposición de aves y vida silvestre en los campos de algodón puede ocurrir, pero los estudios indican que Cry1Ab o Cry2Ae no son intrínsecamente tóxicos para aves o mamíferos. El riesgo de exposición para los organismos acuáticos es extremadamente bajo a través del polen que llegue a los arroyos o ríos, pero el polen de algodón es pesado y pegajoso y se ha reportado que no se desplaza lejos de los campos de algodón. Además los niveles de expresión de las proteínas Cry en el polen son muy bajos y cualquier exposición a éste será mínima.

Con referencia a la tolerancia a los herbicidas que presenta el algodón TwinLink™, se ha generado un cambio en las prácticas agronómicas que podría afectar el hábitat para los organismos no blanco. El algodón tolerante a herbicidas ha hecho más viables prácticas de siembra como labranza de conservación, lo que resulta en un "agro-ecosistema" menos perturbado debido a la reducción de labores de mantenimiento del cultivo. Un mejor desarrollo cultivo del algodón también contribuye a mejorar el hábitat para los pájaros, los insectos y otros animales que se desarrollan en el (Fawcett y Towery, 2004 Anexo 57). En resumen, la adopción de prácticas de mínima labranza o labranza de conservación, contribuyen a reducir la erosión del suelo, el consumo de combustible y otros insumos, y tiene un impacto positivo directo en el bienestar de las especies que se encuentran en entornos agrícolas. . Dado que las poblaciones de malezas se controlan en general con dos aplicaciones herbicidas, el uso de cultivos tolerantes a los herbicidas contribuye a que por lo menos, no se añada una carga adicional sobre los organismos no blanco, por lo tanto, se puede concluir que las proteínas TwinLink™ representan un riesgo mínimo para la flora y fauna.

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)

Para este apartado la información está contenida en los documentos que se someten al departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA), donde separados los eventos se presenta: Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol® cotton Event GHB614; OECD Unique Identifier BCS-GHØØ2-5 (Anexo 52) y Petition for Determination of Nonregulated Status for Insect-Resistant and Glufosinate Ammonium-Tolerant cotton: TwinLink™ cotton (events T304-40 x GHB119); OECD Unique Identifier BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8, (Anexo 53), donde se evalúan los efectos de los eventos sobre cada uno de los

posibles elementos expuestos, tanto a factores bióticos (organismos no blanco, fauna, como alimento para ganado, etc.) como abióticos (suelo y mantos acuíferos).

La autoridad antes citada autorizó la des-regulación para ambos eventos, lo cual se puede comprobar con la copia de autorización apostillada y traducida que se entrega en este documento (Anexo 50b). No obstante, se anexan algunos estudios en donde se evalúan el efecto de los eventos que componen la tecnología GlyTol® TwinLink™.

Dentro delos estudios de riesgo que se pueden analizar encontramos algunos investigadores que estudiaron la posibilidad de flujo de polen entre las especies de algodón.

Van Deynze y Sundstrom (2005, Anexo 47) midieron el flujo de genes mediado por el polen (PGF) en cuatro direcciones durante 2 años, además, se tomaron muestras de los campos de variedades convencionales a diferentes distancias de los campos sembrados con variedades modificadas para evaluar el flujo de polen en condiciones de producción comercial. Los resultados fueron que el flujo era independiente de la dirección de la fuente de polen y disminuyó exponencialmente con el aumento de la distancia desde 7.65% a 0.3 m, a menos de 1% más allá de 9 m cuando había una alta actividad de los polinizadores. En ausencia de poblaciones de polinizadores (abeja, *Apis mellifera* L.), El flujo fue inferior al 1% más allá de 1 m. El flujo de polen en campos comerciales fue consistente con los datos experimentales, con sólo 0.04% de flujo detectado en 1,625 m. Este estudio confirma que el flujo de genes disminuye exponencialmente con la distancia en algodón cultivado y es baja en ausencia de polinizadores, aunque se puede detectar ocurrencia esporádica de flujo hasta 1,625 m.

Otros estudios evalúan el efecto de las proteínas insecticidas sobre polinizadores, tal es el caso del reportado por Duan *et al*. (Anexo 59), quien en el 2008 realizo un estudio en las abejas (*Apis mellifera* L.) que son los polinizadores más importantes de muchos cultivos agrícolas en todo el mundo y son una especie de prueba clave que se utilizan en la evaluación de la seguridad de los cultivos resistentes a los insectos genéticamente modificados. Existe la preocupación de que la siembra generalizada de estos cultivos transgénicos podría dañar las poblaciones de abejas. Se llevó a cabo un meta-análisis de 25 estudios que evaluaron de forma independiente los efectos potenciales de las proteínas Cry de Bt en la supervivencia de la abeja (o mortalidad). Encontrando que las proteínas Cry de Bt utilizadas en los cultivos modificados genéticamente comercializados

para el control de plagas de lepidópteros y coleópteros muestran que no afectan negativamente a la supervivencia de las larvas o de adultos en el laboratorio. Aunque las tensiones adicionales que las abejas se enfrentan en el campo podría, en principio, modificar su susceptibilidad a las proteínas Cry o dar lugar a efectos indirectos, estos hallazgos apoyan las evaluaciones de seguridad que donde no se han detectado efectos negativos directos de los cultivos Bt para este insecto polinizador vital.

El *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria del suelo que forma esporas durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento. Las esporas contienen cristales, que comprende predominantemente uno o más proteínas Cry o Cyt (también conocidos como d-endotoxinas) que tienen actividad insecticida potente y específico. Las diferentes cepas de Bt producen diferentes tipos de toxinas, cada uno de los cuales afecta a un grupo taxonómico estrecho de insectos. Por lo tanto, las toxinas de Bt se han utilizado como pesticidas tópicos para proteger los cultivos, y, más recientemente, las proteínas se han expresado en plantas transgénicas para conferir resistencia inherente a algunas plagas. Los cultivos transgénicos Bt han sido abrumadoramente exitosos y benéficos, lo que lleva a mayores rendimientos y reducción en el uso de plaguicidas químicos y combustibles fósiles. Sin embargo, su despliegue ha atraído algunas críticas en particular con respecto a la posible evolución de cepas de insectos resistentes. Sanahuja *et al*. 2011 (Anexo 60) examinan los progresos recientes en el desarrollo de la tecnología Bt y las contramedidas que se han introducido para prevenir la selección de poblaciones de insectos resistentes.

Adicionalmente se ha estudiado la posible alergenicidad y toxicidad de las proteínas PAT que confieren tolerancia a herbicidas en los eventos GlyTol® TwinLink™,,, en base a una revisión de la literatura publicada y estudios experimentales y la evaluación de la seguridad apoya la conclusión de que los genes (*pat* y *bar*), así como los microorganismos donantes (*Streptomyces*) son inocuos. Las enzimas PAT son altamente específicas y no poseen las características asociadas con las toxinas de los alimentos o alérgenos, es decir, no tienen ninguna homología de secuencia con alérgenos o toxinas conocidas, no tienen sitios de N-glicosilación y se degradan rápidamente en ácidos gástricos e intestinales, y no se encontraron efectos adversos en ratones después de la administración intravenosa de una dosis alta. En conclusión, existe una certeza razonable de que las proteínas PAT que confieren tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, no representa un riesgo significativo en la alimentación humana o en la alimentación animal (Hérouet *et al*. 2004, Anexo 24)

La tolerancia al glifosato puede ser conferida por la disminución de la capacidad del herbicida para inhibir la enzima 5-enol pyruvylshikimate-3-fosfato sintasa, que es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en todas las plantas, hongos y bacterias. En el caso de la tecnología GlyTol® La tolerancia a glifosato se basa en la expresión de la proteína mutante doble 5-enol pyruvylshikimate-3-fosfato sintasa (2mEPSPS). La proteína 2mEPSPS, con una menor afinidad de unión para el glifosato, es altamente resistente a la inhibición por glifosato y por lo tanto permite la actividad enzimática suficiente para que las plantas crezcan en la presencia de herbicidas a base de glifosato. En base a una revisión de la literatura publicada y estudios experimentales, se evaluaron los posibles problemas de seguridad relacionados con la proteína 2mEPSPS. La evaluación de seguridad determinó que la proteína expresada es inocua. La enzima 2mEPSPS no posee ninguna de las propiedades asociadas a toxinas o alérgenos conocidos, como la falta de similitud con secuencia de aminoácidos de toxinas y alérgenos conocidos, una rápida degradación en los fluidos gástricos e intestinales simulados, y sin efectos adversos en ratones después de ser expuestos por vía intravenosa o vía oral (a 10 o 2000 mg/kg de peso corporal, respectivamente). En conclusión, existe una certeza razonable de ningún daño resultante de la exposición a la proteína 2mEPSPS en la alimentación humana o en la alimentación animal Herouet-Guicheney *et al*. 2009 (Anexo 26).

Rouquie (2006, Anexo 58) evaluó el potencial de similitud de la secuencia aminoácidos de la proteína doble mutante del maíz 5-enol pyruvylshikimate-3-fosfato sintasa (2mEPSPS) con toxinas o alérgenos conocidos. La comparación de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS se llevó a cabo mediante un estudio en general de homologías la secuencia aminoácidos con todas las secuencias de proteínas presentes en las siguientes bases de datos de referencia: Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PIR, NRL-3D, DAD y Genpept. El algoritmo utilizado fue BLASTP 2.2.2 y la matriz de puntuación usada fue BLOSUM62. El criterio que indica la posible toxicidad o alergenicidad era una identidad del 35% en una ventana de 80 aminoácidos con una toxina o proteína alergénica. Los resultados de la búsqueda general de homología con la proteína 2mEPSPS mostraron ninguna identidad con toxinas o alérgenos conocidos, sólo con otras proteínas EPSPS, de diversos orígenes que tienen un excelente historial de seguridad. En conclusión, los resultados apoyan que es poco probable que el gen *2mepsps* codifique proteínas tóxicas o alergénicas.

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

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

- ✓ **Manejo de plagas**

Entre las principales plagas lepidópteras del algodonero se encuentran el complejo bellotero *(Heliothis virescens* Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie), el gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith). El control de estas plagas se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro (Tabla 20), los cuales han tenido un impacto negativo en el ambiente y el uso irracional de estos productos ha generado resistencia en las plagas a un gran número de insecticidas (Pacheco, 1994; Hake *et al.,* 1996; Machain *et al.,* 1988; Machain *et al.,* 1995).

Durante el periodo de evaluación experimental de la tecnología GlyTol® TwinLink™ en México, se ha observado una reducción consistente en la cantidad de insecticidas utilizados en la producción de algodón. La reducción en el uso de insecticidas contribuye a conservar los combustibles que de otra manera tendrían que consumirse para la transportación y aplicación de insecticidas. Las materias primas y grandes cantidades de agua necesarias para manufacturar y aplicar insecticidas también pueden ser conservadas. Recursos para transportación y espacio previamente utilizado en la aplicación de insecticidas también es liberado para otros usos. La reducción en el uso de insecticidas en algodón GlyTol® TwinLink™ contribuye a reducir la posibilidad de contaminación del suelo, agua y aire y disminuye significativamente las grandes cantidades de envases de plástico en el campo.

La tecnología GlyTol® TwinLink™ y otras tecnologías de resistencia a insectos son totalmente compatibles con los principios del manejo integrado de plagas (MIP), debido a que la tecnología de resistencia a insectos controla únicamente algunas especies de lepidópteros, por lo cual muchos

insectos benéficos además de no ser afectados por la tecnología son beneficiados por la reducción en el uso de plaguicidas en el cultivo.

Tabla 20. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodonero (CICOPLAFEST, 1998; SAGAR, 2000; PLM, 2006)

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

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

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

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

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

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

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

- La naturaleza, eficacia y modo de empleo del producto para cultivos Bt.
- Nivel de expresión (dosis requerida para controlar todos o la mayoría de los insectos heterocigotos, de tal manera que la resistencia es un fenómeno funcionalmente recesivo).
- Superficie sembrada con cultivos Bt en un área determinada.
- Genética de la resistencia (frecuencia inicial de alelos de resistencia, grado de dominancia de dichos alelos, costo fisiológico de la resistencia).
- Comportamiento de los insectos (movimiento y reproducción).
- El modo en el que los insectos se mueven entre los cultivo Bt y convencionales determina el nivel de exposición de los insectos a la toxina Bt, así como la probabilidad de cruzamiento entre insectos resistentes y susceptibles.
- Estudios realizados en maíz y algodón indican que los insectos tienden a dispersarse en grandes distancias (FIFRA SAP, 1998).

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

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

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

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

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

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

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

En su caso un refugio 96:4: Por cada 40 ha sembradas con algodón Bt el productor deberá sembrar 1.6 ha con variedades de algodón que no expresa proteínas de *Bacillus thuringiensis*, que serán asperjadas con cualquier insecticida convencional, excepto biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* y los insecticidas usados específicamente para el control de complejo bellotero y gusano rosado. Algunos ingredientes activos que no podrán ser utilizados por el productor en esta

opción de refugio son acefate, Bt, clorpirifos etil, fenvalerato, metomil, monocrotofós, sulprofos, thiodicarb, profenofos y piretroides sintéticos (cyflutrina, bifentrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina, lambda cyhalotrina, tralometrina y otros).

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

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

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

- ✓ **Manejo de la maleza**

Uno de los mayores beneficios de las tecnologías de tolerancia a herbicidas, ha sido la adopción de sistemas de labranza reducida, es decir, menos pasos de labranza. Esta reducción hace que el suelo esté más protegido, se erosione menos y conserve la humedad y la materia orgánica se descomponga y se integre al suelo. El porcentaje de incremento de este sistema ha sido más alto en algodón que en ningún otro cultivo debido a la adopción tan alta de tecnologías de tolerancia a herbicidas, incrementos en el precio del diesel, mejores herbicidas que controlan el mayor espectro

de malezas con mayor efectividad. Sin embargo, la principal razón de este incremento en prácticas de labranza reducida ha sido la disponibilidad de las tecnologías de tolerancia a herbicidas (Sankula, 2006).

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

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

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

En cuanto al comportamiento del herbicida en el ambiente, se sabe que en plantas después de la aplicación ocurre una rápida degradación del ingrediente activo en el suelo. La absorción de los productos de degradación por las plantas en suelos tratados es muy pobre. El mayor metabolito encontrado es el MPP (3-methylphosphinico-propionic acid). Se ha encontrado en estudios con carbono 14 que estos productos de degradación se incorporan al metabolismo de las plantas y

producen compuestos naturales. En plantas tolerantes, la sustancia activa se desintoxica rápidamente por acetilación y formación de N-acetyl-glufosinate (NAG).

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

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

Basados en estos valores, ni el ingrediente activo ni los principales metabolitos pueden considerarse como persistentes. En el agua, el metabolismo es el mismo que el que se presenta en el suelo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 21. Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados

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

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

En Brookes, G. y P. Barfoot. (2006), se presenta una extensa revisión de lo que ha sucedido con el algodón tolerante a herbicidas obtenido por medio de la biotecnología moderna.

El algodón genéticamente modificado con el evento LL25® (LibertyLink®) de tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y el algodón con el evento GlyTol® no presentan diferencias con respecto a su contraparte convencional en cuanto a su comportamiento agronómico, morfología, desarrollo fenológico, calidad de la semilla y calidad de fibra.

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

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

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

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

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

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

Amaranthacea). Por otro lado, Glufosinato de amonio presenta un amplio espectro de control contra especies de hoja ancha que Glifosato, por ejemplo contra malezas como Correhuela (*Convolvulus arvensis*, Fam. Convolvulácea), Malva (*Malva parviflora*, Fam. Malvacea), Cadillo (*Xanthium strumarium*, Fam. Asteraceae) y Amargosa (*Parthenium hysterophoru*), Fam. Asteraceae) entre otras.

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

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

El algodón TwinLink™ ha sido liberado de manera experimental en los Estados Unidos de América y fue desregulado a finales del año pasado; en la Carpeta de Anexos y Referencias se incluye la Notificación del estado No-regulado del mismo (TL-dereg-2011-26349), publicado el 12 de octubre de 2011 en el Registro Federal (Federal Register). Por lo que respecta al algodón GlyTol®, USDA ha determinado que ya no es un evento regulado (USDA notification GlyTol (GHB614) (Anexo 50c)).

En el anexo 50b se encuentra la copia apostillada de la autorización de la USDA así como su copia traducida por un perito autorizado en México.

VI. Consideraciones sobre los riesgos de las alternativas tecnológicas con que se cuente para contender con el problema para el cual se construyó el OGM, en caso de que tales alternativas existan.

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

Tanto los métodos como su forma de implementación han ido evolucionando al paso del tiempo gracias a los avances que se han obtenido a través de instituciones públicas y de organizaciones privadas, con lo cual en la actualidad se puede intentar resolver el problema desde varias vías que incluyen desde métodos mecanizados hasta el uso de productos químicos.

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

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

En Kansas (NAS, 1980), 16 operaciones de labranza a intervalos de 12 días después del brote erradicaron *Convolvulus arvensis*. El requisito esencial para la erradicación de *C. arvensis* es programar la labranza en relación con el agotamiento de las reservas alimenticias de sus raíces (NAS, 1980), y el laboreo deberá empezar no más tarde que el inicio de brotación de *C. arvensis*; después del corte, las pérdidas de reservas a partir de las raíces continúan por dos semanas,

antes de que las hojas envíen alimento hacia las raíces, por lo cual el laboreo deber programarse a intervalos entre 14 y 18 días después del brote (Philips and Timmons 1954, citados por Muzik, 1970; NAS, 1980).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

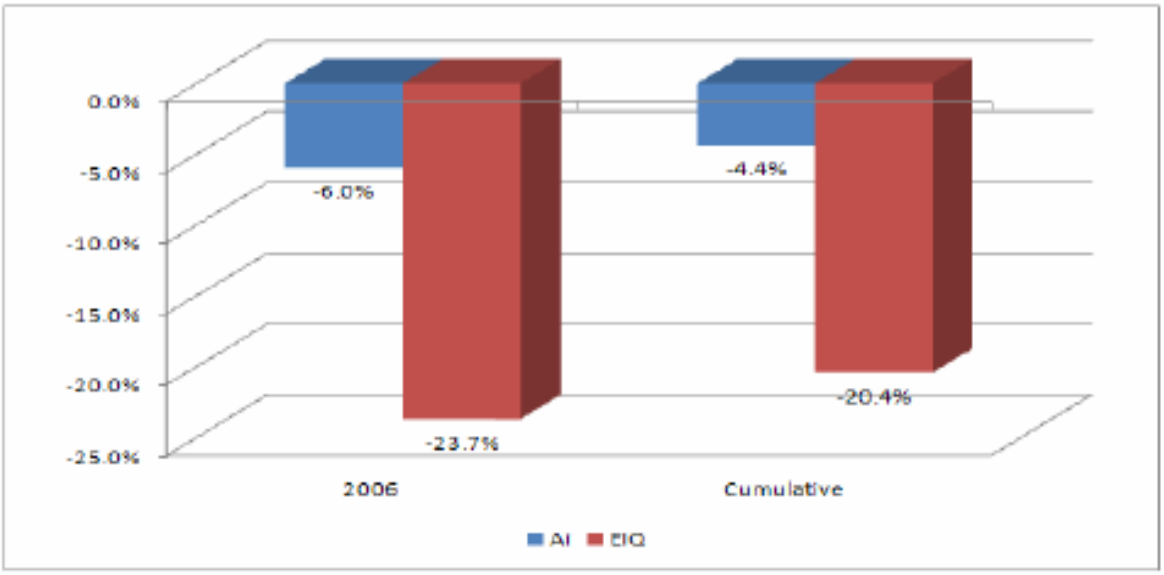


Figura 23. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a los herbicidas en los países que han adoptado esta tecnología de 1996-2006

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

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

Tabla 22. Consumo de combustible por el uso del tractor, por método de labranza

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

Fuente: Adaptado de Jasa (2002) y CTIC 2004

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

Tabla 23. Impacto de cambios en el uso de herbicidas e insecticidas por la cultivación global de los cultivos GM de 1996 a 2006

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

EIQ= Environmental Impact Quotient (Coeficiente de impacto ambiental)

VII. Número de autorización expedida por SALUD cuando el OGM tenga finalidades de salud pública o de biorremediación.

El evento genético combinado GLT: GlyTol® TwinLink™ (GHB614 x T304-40 x GHB119) cuenta con la formal autorización No. 123300913X0001 de fecha 14 de septiembre de 2012 (Anexo 50a), expedida por la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

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

Se solicita el permiso para el ciclo agrícola P-V 2016. Este periodo incluye actividades previas a la siembra del algodón GLT tales como planeación de los estudios a realizar e importación de la semilla, el ciclo agrícola hasta la cosecha (seis meses) y seguimiento al momento y después del despepite.

Información Adicional

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

La cantidad de semilla a importar para la operación del permiso es la solicitada y estará sujeta a la cantidad autorizada al final de la evaluación para este permiso, siendo 510kg que ingresaran por la aduana en Cd. Juárez, Chihuahua o Nuevo Laredo, Tamaulipas.

Ruta de movilización de la semilla GM y medidas de bioseguridad para su traslado

La ruta de movilización, será por tierra a partir del origen de la semilla en los Estados Unidos de América. Posteriormente entrará a México a través de una aduana en Cd. Juárez, Chihuahua o Nuevo Laredo, Tamaulipas; en caso necesario y sólo para hacer más eficiente la introducción a México, se buscaría otra aduana, como Matamoros, Reynosa o Mexicali. De la aduana se transportará por carretera directamente al almacén de Bayer, ubicado en la siguiente dirección:



Origen: Cd. Juárez, Chihuahua.

Destino: Delicias, Chihuahua

Figura 24. Ruta de movilización de Cd. Juárez a delicias, Chihuahua.

Las medidas de bioseguridad que se van a utilizar durante las diferentes etapas de la movilización son:

Embarque de la semilla

1. Las semillas de algodón GM 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 (Anexos 61 y 63).
2. AI 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 de las bolsas.
3. Los envases (bolsas) estarán claramente identificados mediante etiquetas visibles (Anexo 62).
4. 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 la empresa Bayer de México sea notificada al número: (55) 5728 3000 Ext 2726. El procedimiento incluye:
   a) Hacer todos los esfuerzos por recuperar el material liberado y destruir por medio de incineración el material que permanece derramado.
   b) Identificar el sitio del accidente y establecer un programa de monitoreo por un periodo de un año para identificar la presencia de plántulas voluntarias y proceder a su destrucción inmediata por métodos mecánicos o químicos (herbicidas).
   c) Notificar a la autoridad competente al correo electrónico: libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx, de acuerdo a lo establecido en el Artículo 59 del Reglamento de la LBOGM, dentro de las 24 horas siguientes que se tenga conocimiento de la misma e informar de manera oficial en un máximo de 3 días hábiles a la ventanilla de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP).
   d) Documentar exhaustivamente todas las acciones realizadas, incluyendo la hora y la fecha de cada acción.
   e) Informar a la autoridad competente sobre el plan de acción que se implementará.

Etiquetado de los envases

Todos los envases individuales estarán etiquetados con la siguiente información:

Science For A Better Life

GlyTol® TwinLink™

BAYER DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
Miguel de Cervantes Saavedra No. 259, Col. Ampliación Granada, 11520 México, D.F., Tel. (55) 57 28 30 00
R.F.C. BME820511SU5

SEMILLA GENETICAMENTE MODIFICADA

SEMILLA DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum* L.) VARIEDAD: Indicada en la bolsa

Tecnología: GlyTol® TwinLink™
Identificador OCDE: BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8
Germinación: 80% (MIN)
Semilla pura: 99%
Materia inerte: 1% (MAX)
Semilla de maleza nociva/kg: Ninguna
Semilla de otros cultivos: Ninguna
Categoría de la semilla: Declarada
Fecha de análisis de germinación: Información en la bolsa
Número de Lote: Información en la bolsa

Contenido neto: 220,000 semillas.
Importante: Sacos llenados por conteo de semilla, el peso puede variar entre 21 - 25 kg/bolsa.

Semilla producida en Estados Unidos de América por: Bayer CropScience USA 3223 South Loop 289, Suite 325, Lubbock, Texas, 79423, USA.
Exportada por: Bayer CropScience USA 3223 South Loop 289, Suite 325, Lubbock, Texas, 79423, USA.
Importada por: Bayer de México, S.A. de C.V.

Tratamiento de la semilla: Desborre químico a base de ácido, semilla tratada con fungicidas e insecticidas.

Fungicidas: Vortex® FS (ipconazole), Allegiance® FL (metalaxyl), Spera® 240 FS (myclobutanil), EverGol® Prime (penflufen).

Insecticidas: Gaucho® 600 (imidacloprid)

ADVERTENCIA: ESTA SEMILLA HA SIDO TRATADA CON PLAGUICIDAS, por lo tanto:

- "Manténgase fuera del alcance de los niños, mujeres embarazadas, en lactancia y animales domésticos"
- "No se transporte ni se almacene junto a productos alimenticios o forrajes"
- "No se almacene en casas habitación"
- "No se utilice como alimento ni para extracción de aceite"

Variedad Genéticamente Modificada: El algodón GlyTol® LibertyLink® (GL) expresa las proteínas PAT de *Streptomyces hygroscopicus* y 2mEPSPS del maíz, que le confieren tolerancia a las aplicaciones totales de

los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, permitiendo el uso de dos mecanismos de acción herbicida para un manejo más eficiente de la maleza en el cultivo del algodón.

Se deben seguir los lineamientos establecidos en el contrato de licencias de Bayer.

Para su manejo agronómico, se sugiere seguir las indicaciones de manejo para el algodonero del campo experimental del INIFAP más cercano. La temperatura de suelo mínima para obtener una buena germinación y emergencia de la semilla de algodón es de 18°C. Siembras realizadas cuando el clima no permita estas condiciones pueden resultar en un mal establecimiento del cultivo.

Aviso:
"Esta Semilla Genéticamente Modificada no debe sembrarse, cultivarse o producirse fuera de las zonas autorizadas para su liberación"
"El uso de esta semilla genéticamente modificada implica cumplir las medidas de bioseguridad y condicionantes contenidas en el permiso de liberación al ambiente"
"En caso de liberación accidental, repórtelo a: libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx

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

En los Anexos 61 y 62 se muestra la evidencia fotográfica del empaque y etiquetado de las bolsas en las que es transportada la semilla. Cabe señalar que en los reportes de resultados de las liberaciones en etapa experimental precedentes, se proporcionó información sobre las especificaciones del material de empaque.

Documentación para el transporte de la semilla de algodón GM.

- Lista de inventario de todos los envases, embalajes y materiales que se envían especificando la fecha de envío.
- Guía original de transporte especificando claramente la fecha de envío con la lista de inventario anexa.
- 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 envió.
- Todos los documentos relacionados con el transporte de la semilla de algodón GM deben mantenerse bajo resguardo.
- Las empresas transportistas serán provistas de una hoja de datos de seguridad para transporte, desarrollada específicamente para semillas genéticamente modificadas (Anexo 64).

B) El diseño experimental que se llevarán a cabo durante la liberación en etapa experimental.

Dentro de la evaluación que se pretende realizar del cultivo de algodón GlyTol® TwinLink™ (GLT) siguiendo el objetivo plantado de comparar la equivalencia fenotípica del algodón GLT con su contraparte convencional, así como documentar los beneficios, el impacto y uso seguro de la tecnología del cultivo de algodón GlyTol® TwinLink™ en la región agrícola del Norte y Sur de Tamaulipas, se presenta en el Anexo A, el protocolo detallado que se propone para la liberación en etapa experimental dentro de las zonas agrícolas del Norte y Sur de Tamaulipas durante el ciclo agrícola P-V 2016.

Referencias

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

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

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

Bayer, E., Gugel, K. H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W.A. and Zähner, H. 1972. Phosphinothricin and phosphinothricyl-alanyl-alanine. Helvetica Chimica Acta, 55(25), 224-239. #A35993 (Anexo 12)

Berardi L.C. and Goldblatt L.A. 1980. Gossypol. *In* Toxic constituents of plant foodstuffs. 2nd Ed., I.I. Liener, ed., Academic Press, New York. 183-237. IRN: M-208032-01-1 (Anexo 28)

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

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

Bremmer, J., Ebert, E., Heusel, R., Sochor, H., Sonder, K., Stumpf, K., Weller, O. and Zumdick, A. 1997. Glufosinate-ammonium, code: AE F039866; short summary on the active substance. AgrEvo report no. PSR97/006. #A59530 (Anexo 33).

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

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

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

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

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

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

Cherry J.P., Leffler H.R. 1984. Seed. In Cotton (Kohel, R.J. and Lewis, C.F., eds.) Amer. Soc. Agron. Madison, WI. 511-558. # M-208069-01-1 (Anexo 29)

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

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

Currier, 2009. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* combined event GLT (GHB614). Bayer CropScience. Internal report. 30 pages (Anexo 40).

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

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

Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. 1982. Nopaline synthase : transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics, 1, 561-573. # A50621 (Anexo 11)

Duan, J.J.; Marvier, M.; Huesing, J.; Dively, G.; Huang, Z. 2008. A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). PLoS ONE, v.1, p.1-6, (www.plosone.org). (Anexo 59)

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

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

Fawcett, R., Towery, D. 2004. Conservation Tillage and Plant Biotechnology: How New Technologies Can Improve the Environment By Reducing the Need to Plow. Conservation Technology Information Center. 1220 Potter Drive, Suite 170, West Lafayette, IN 47906. www.ctic.purdue.edu. (Anexo 57)

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

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

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

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

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

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

Habex V. 2007. Full DNA sequence of event insert and integration site of Gossypium hirsutum transformation event GHB614. Bayer CropScience. Internal report. 43 pages. #M-278542-02-1 (Anexo 7)

Habex, V.. 2006. Structural stability analysis of GlyTol Cotton event GHB614. Bayer BioScience N.V. Internal Report 2006-GHB614-NAC005. 20 pages (Anexo 39).

Habex V., Lecleir M. 2006. Demonstration of the nature of the flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience. Internal report. 49 pages. #M-279393-01-1 (Anexo 5)

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

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

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

Hérouet C. 2004. Assessment of the toxicity and allergenicity of the PAT protein (*bar* gene). Bayer CropScience. Internal report. 41 pages. #C045036 (Anexo 23).

Hérouet C., Esdaile D.J., Mallyon B.A., Debruyne E., Schulz A., Currier T., Hendrick K., van der Klis R.J., Rouan D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology 41: 134–149. C047049 (Anexo 24).

Hérouet-Guicheney C., Rouquie D., Freyssinet M., Currier T., Martone A., Zhou J., Bates E.E.M., Ferullo J.M., Hendrick K., Rouan D. 2009. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphatesynthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology 54: 143-153. M-349666-01-1 (Anexo 26).

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

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

Kareiva P., Morris W., Jacobi C. 1994. Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and their wild relatives. Molec. Ecology 3. 15-21. (Anexo 55)

Keys, A.J., Bird, I.F., Cornelius, M.J., Lea, P.J., Wallsgrove, R.M. and Miflin, B.J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. Nature, 275, 741-743. # C010220 (Anexo 34).

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

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

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

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

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

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

Lemaux, P.G. 2009. Genetically Engineered plants and foods: a scientist´s analysis of the issues (part II). Annu. Rev. Plant Biol. V.60, p.511-559, 2009. LEMAUX.

McGregor, S.E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants, Agricultural Handbook No. 496, Unites States Department of Agriculture Research Service, Washington, DC. (Anexo 54)

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

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

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

Manderscheid, R. and Wild, A. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. Journal of Plant Physiology, 123, 135-142. # A34372 (Anexo 32).

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

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

Mertens, K. and Moens, S. 2008. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 over different generations, in different backgrounds and grown in different environments. Bayer CropScience. Internal report. 27 pages. # BIO2-004 (Anexo 37).

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

Miflin, B.J. and Lea, P.J. 1977. Amino acid metabolism. Annual Review of Plant Physiology, 28, 299-329. #C013685 (Anexo 13)

Moens, S. and De Pestel, K. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40. Bayer CropScience. Internal report. 56 pages. # BBS08-002 (Anexo 3).

Murakami, T., Anzai, H., Imai, S.,Sathah, A., Nagaoka, K. and Thompson, C.J. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of Streptomyces hygroscopicus : Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Molecular and General Genetics, 205, 42-50. # A50613 (Anexo 2)

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

Oberdörfer R. 2003. Nutritional impact assessment report on glufosinate ammonium-tolerant cotton transformation event LLCotton25. Bayer CropScience. Internal report. 356 pages. #C029575 (Anexo 25).

Oberdörfer,R. 2007. Nutritional impact assessment report on glyphosate tolerant cotton transformation event GHB614. Bayer CropScience. Internal report. 97 pages. #M-289161-02-1 (Anexo 18)

Oberdörfer, R. 2008. Summary of the Statistical Analysis of Bt Cotton (event GHB119) vs Non-transgenic Counterpart (Coker 312). Dart number: M-303417-01-1 (Anexo 17).

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control protein. 109 pages. DART number: M-299794-01-1 (Anexo 27).

Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. Nature, 313, 810-812. #A67238 (Anexo 9).

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

Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol® cotton Event GHB614; OECD Unique Identifier BCS-GHØØ2-5, 2006. Bayer CropScience. 173pp. (Anexo 52)

Petition for Determination of Nonregulated Status for Insect-Resistant and Glufosinate Ammonium-Tolerant cotton: TwinLink™ cotton (events T304-40 x GHB119); OECD Unique Identifier BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8, 2008. Bayer CropScience. 205pp. (Anexo 53)

Phelps R.A., Shenstone F.S., Kemmerer R.J., Evans, R.J. 1965. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. Poult. Sci. 44. 358-394. # M-207994-01-1 (Anexo 30).

Ridley, S.M. and McNally, S.F. 1985. Effects of phosphinothricin on the isoenzymes of glutamine synthetase isolated from plant species which exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide. Plant Science, 39, 31-36. #C002159 (Anexo 35).

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

Rouquié D. 2006. 2mEPSPS protein - Overall amino acid sequence homology search with known toxins and allergens. In silico study report SA 06103. Bayer CropScience internal report. M-273792-01-1. 350 pages. (Anexo 58)

Rouquié, D. 2007a. Cry1Ab protein - In vitro digestibility in simulated intestinal fluid. Study number SA 07111. Bayer CropScience. December 05, 2007. 54 pages. DART number: M-295264-01-1 (Anexo 19).

Rouquié, D. 2007b. Cry1Ab protein - In vitro digestibility in simulated gastric fluid. Study number SA 07110. Bayer CropScience. December 05, 2007. 56 pages. DART number: M-295272-01-1 (Anexo 20).

Rouquié, D. 2008a. Cry2Ae protein - In vitro digestibility in simulated gastric fluid. Study number SA 08126. Bayer CropScience. October 09, 2008. 55 pages. DART number: M-308906-01-1 (Anexo 21).

Rouquié, D. 2008b. Cry2Ae protein - In vitro digestibility in simulated intestinal fluid. Study number SA 08127. Bayer CropScience. October 09, 2008. 52 pages. DART number: M-308911-01-1 (Anexo 22).

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

Sadaaki Mase. 1984. Meiji Herbiace : common name bialaphos : a new herbicide. Japan pesticide information, number 45, 27-30. #A50614 (Anexo 14)

Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.M.; Capell, T. Christou, P. 2011. Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnology Journal, p.1-18,. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x (Anexo 60)

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

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

Sauer, H., Wild, A. and Rühle, W. 1987. The effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis : II. The causes of inhibition of photosynthesis. Bioscience, 42c, 270-278. # A40320 (Anexo 36).

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

Sundstrom F.J. 2001. Pollen Transfer in Cottonseed Production. In The Biotech Evolution of the Seed Industry: Adventitious Presence, Quality Assurance and Orderly Marketing. Rosemont, IL, April 9. Proceedings. 31-36. (Anexo 56)

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

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

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

Thompson, C.J., Movva Rao, N., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal, 6(9), 2519-2523. # A40266 (Anexo 10)

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

Van Deynze, A. E., Sundstorm, F.J., and Bradford, K.J. 2005. Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity. Crop Sci. 45:1565–1570. (Anexo 47)

Van der Klis R.J., Hendrickx K., Hérouet-Guicheney C., Rouan D. 2006. The double mutant 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase gene product: 2mEPSPS. Description and characterization. Bayer CropScience. Internal report. 59 pages. M-277049-01-1 (Anexo 6)

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

Verhaeghe, S. and Habex, V. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119. Bayer CropScience. Internal report. 41 pages. # BBS08-001 (Anexo 4).

Verhaeghe, S. and Criel, I. 2008. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments. Bayer CropScience. Internal report. 25 pages. # BIO2-005 (Anexo 38).

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

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

Wendler, C. and Wild, A. 1990. Effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis and photorespiration. Z. Bioscience, 45c, 535-537. # C013885 (Anexo 16)

Wild, A. and Manderscheid, R. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Bioscience, 39c, 500-504. # C013886 (Anexo 31)

Wild, A., Sauer, H. and Rühle, W. 1987. The effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis: I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. Bioscience, 42c, 263-269. # A40321 (Anexo 15)

Zambryski, P. 1988. Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. Ann. Rev. Genet. 22:1-30. #C034163 (Anexo 8)

Zeng, L.; Meredith, W.R.; Campbell, B.T.; Dever, J.K.; Zhang, J.; Glass, K.M.; Jones, A.S.; Myers, G.O. and Bourland, F.M. 2014. Genotype by environment interaction effects on lint yield of cotton cultivars across major regions in the U.S. Cotton Belt. The Journal of Cotton Science 18:75–84. (Anexo 51)