



SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE DE ALGODÓN GLYTOL™ TWINLINK™ PLUS (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102; OECD: BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7) EN ETAPA EXPERIMENTAL, EN LAS REGIONES AGRÍCOLAS CHIHUAHUA-COMARCA LAGUNERA Y TAMAULIPAS SUR, CICLO PV-2016.

México, D.F., a 26 de noviembre de 2015

Este documento contiene información confidencial y está destinado para uso exclusivo de la autoridad regulatoria a la que se somete por Bayer de México, S.A. de C.V. y solo puede ser usado para respaldar las acciones solicitadas por Bayer de México, S.A. de C.V. Al presentar estos documentos y materiales, Bayer de México, S.A. de C.V. no está otorgando a cualquier parte o entidad algún derecho o licencia de uso sobre el material, la información o la propiedad intelectual descrita en dichos documentos.



CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	9
LISTA DE FIGURAS	12
I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM.	17
a) Identificador único del evento de transformación.	17
b) Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México.	17
c) Existencia de especies sexualmente compatibles.	22
d) Hábitats de persistencia o proliferación.....	23
e) Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética.	24
1. Organismo receptor.....	24
2. Organismos donadores para los eventos GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	25
3. Identificación de los organismos donadores para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.....	26
3.1. Maíz (<i>Zea mays</i>).....	26
3.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
3.3. <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	28
3.4. <i>Escherichia coli</i>	28
3.5. Historial de uso seguro de los organismos donantes.	29
4. Identificación de los organismos donadores de secuencias reguladoras.	29
4.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
4.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
4.3. <i>Zea mays</i>	32
4.4. <i>Helianthus annuus</i>	32
4.5. <i>Oryza sativa</i>	33
4.6. <i>Flaveria bidentis</i>	34
4.7. <i>Petunia hybrida</i>	34
4.8. Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV).....	35
4.9. Virus del mosaico de la coliflor (CaMV).....	35
4.10. Virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV).	35
f) País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido.	36
g) Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor.....	36
1. Origen y diversificación del algodón.	36
2. Especies silvestres y distribución.	37
h) Secuencia génica detallada del evento de transformación (tamaño del fragmento, sitio de inserción y oligonucleótidos).	41
1. Evento GHB614.	41
2. Evento T304-40.....	43
3. Evento GHB119.	44
4. Evento COT102.....	44
i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros con demostración de resultados.	45
1. Secuencias flanqueantes.....	45
1.1. Evento GHB614.	45
1.2. Evento T304-40.	46
1.3. Evento GHB119.	46
1.4. Evento COT102.	47



2. Número de copias.	48
2.1. Evento GHB614.	48
2.2. Evento T304-40.	50
2.3. Evento GHB119.	51
1.4. Evento COT102.	52
3. Expresión.	53
j) Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres, expresión de las proteínas y su localización.	56
1. Mapas de las construcciones genéticas.	56
1.1. Evento GHB614.	56
1.2. Evento T304-40.	58
1.3. Evento GHB119.	60
1.4. Evento COT102.	62
2. Tipo de herencia de los caracteres.	64
2.1. Evento GHB614.	64
2.2. Evento T304-40.	66
2.3. Evento GHB119.	66
2.4. Evento T304-40 x GHB119.	67
2.5. Evento COT102.	68
2.6. Algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).	69
3. Expresión de proteínas y su localización.	69
k) Descripción del método de transformación.	72
1. Evento GHB614.	72
2. Evento T304-40.	73
3. Evento GHB119.	73
4. Evento COT102.	74
5. Algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).	74
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.	75
1. Evento GHB614.	75
1.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.	75
1.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.	75
1.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.	75
1.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.	76
1.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.	78
2. Evento T304-40.	79
2.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.	79
2.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.	79
2.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.	80
2.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.	80
2.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.	81
3. Evento GHB619.	82
3.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.	82
3.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.	82
3.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.	82
3.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.	82
3.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.	83
4. Evento COT102.	85



m) Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples.	85
1. Proteína 2mEPSPS.	85
2. Proteína Cry1Ab.	86
3. Proteína Cry2Ae.	86
4. Proteína PAT.	86
5. Proteína Vip3Aa19.	87
6. Proteína APH4.	87
n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios.	88
1. Proteína 2mEPSPS.	88
2. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.	90
2.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.	90
2.2. Unión al receptor.	91
2.3. Inserción en la membrana y formación de poro.	92
2.4. Citólisis.	92
2.5. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.	92
3. Proteína PAT/ <i>bar</i>	93
4. Proteína Vip3Aa19.	95
5. Proteína APH4.	96
o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos.	97
1. Proteína 2mEPSPS.	97
2. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.	99
2.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.	99
2.2. Unión al receptor.	100
2.3. Inserción en la membrana y formación de poro.	101
2.4. Citólisis.	101
2.5. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.	101
3. Proteína PAT/ <i>bar</i>	102
4. Proteína Vip3Aa19.	104
5. Proteína APH4.	105
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.	106
q) Patogenicidad o virulencia de los organismos receptores y donadores.	108
1. Organismo receptor – algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>).	108
1.1. Usos del algodón.	108
1.2. Semilla de algodón para alimentación animal.	108
1.3. Productos derivados de semilla de algodón.	109
2. Organismos donadores para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.	111
2.1. Maíz (<i>Zea mays</i>).	111
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	112
2.3. <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	112
2.4. <i>Escherichia coli</i>	113
3. Organismos donadores de los elementos reguladores.	113
3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	114
3.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	114
3.3. <i>Zea mays</i>	115
3.4. <i>Helianthus annuus</i>	116
3.5. <i>Oryza sativa</i>	117



3.6. <i>Flaveria bidentis</i>	117
3.7. <i>Petunia hybrida</i>	118
3.8. Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV).....	118
3.9. Virus del mosaico de la coliflor (CaMV).....	119
3.10. Virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV).	119
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.	120
1. Gen <i>2mepsps</i>	120
2. Gen <i>bar</i>	121
3. Gen <i>aph4 (hptI)</i>	123
s) Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgen.	123
1. Evento GHB614.	123
2. Evento T304-40.....	124
3. Evento GHB119.	126
4. Evento COT102.....	126
5. Evento GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.	127
t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados.	127

II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA O ZONAS DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM. ...134

a) Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.....	134
b) Ubicación, en coordenadas UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.....	135
c) Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según características de diseminación del OGM.....	137
1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos.	137
2. Descripción geográfica.	143
2.1. Municipios.....	143
2.2. Distritos de Desarrollo Rural (DDR).	144
2.3. Áreas Naturales Protegidas (ANP).....	145
2.4. Ecorregiones nivel IV.	146
3. Plano de ubicación señalando las principales vías de comunicación.....	148

III. ESTUDIO DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA.150

a) Estabilidad de la modificación genética del OGM.	150
1. Evento GHB614.	150
2. Evento T304-40.....	151
3. Evento GHB119.	152
4. Evento COT102.....	153
5. Evento GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.	153
b) Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína en diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren.	154
c) Características del fenotipo del OGM.....	157
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.....	158



e) Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica.	159
f) Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM.	164
1. Algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.	164
2. Inocuidad de la proteína 2mEPSPS.	165
3. Inocuidad de la proteína PAT/ <i>bar</i>	165
4. Inocuidad de las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.	165
5. Inocuidad de la proteína Vip3Aa19.	167
6. Potencial como maleza.	168
g) Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad.	169
h) Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas.	169
1. Mecanismos de cruzamiento con especies del genero <i>Gossypium</i>	169
2. Mecanismos necesarios para el intercambio genético.	170
3. Vigor de híbridos interespecíficos y fertilidad.	171
i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.	173

IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD A LLEVAR A CABO.177

a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad	177
1. Plan de monitoreo detallado.	177
1.1. Obtención del Permiso de Liberación al Ambiente (PLA).	177
1.2. Análisis de medidas de bioseguridad y condicionantes.	177
1.3. Convenio de investigación.	177
1.4. Importación y almacenaje de la semilla.	178
1.5. Movilización de la semilla.	180
1.6. Capacitación en el cumplimiento de medidas de bioseguridad y <i>stewardship</i>	181
2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM.	182
2.1. Siembra del ensayo.	182
2.2. Limpieza de maquinaria.	185
2.3. Evaluación de la tecnología.	185
2.4. Acceso al ensayo.	185
2.5. Auditorías internas de cumplimiento.	186
2.6. Auditorías internas de <i>Stewardship</i>	186
2.7. Visitas de Inspección de SENASICA.	186
2.8. Destrucción del ensayo.	186
2.9. Monitoreo de plantas voluntarias.	186
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.	187
b) Medidas y procedimientos de bioseguridad.	187
1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas dónde se pretende realizar la liberación.	187
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 al área de liberación a dicha zona o zonas.	191
3. Medidas para erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas.	192
4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar el OGM.	192



5. Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado.	192
5.1. Medidas de control para prevenir un evento de liberación no intencional.....	192
5.2. Autorizaciones regulatorias de los eventos GHB614, T304-40, GHB619 y COT102. .	193
5.3. Seguridad de la proteína 2mEPSPS.	194
5.4. Seguridad de las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.	195
5.5. Seguridad de la proteína PAT/ <i>bar</i>	196
5.6. Seguridad de las proteínas Vip3Aa19 y APH4.	196
6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación.	198
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.....	198
a) Descripción de la zona en donde se realizó la liberación.	198
b) Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna.	200
1. Tecnología GlyTol® (GHB614).....	200
2. Tecnología TwinLink™ (T304-40 x GHB119).....	201
3. Tecnología COT102.	202
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).....	203
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.	205
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.	207
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.	208
1. Malezas en el cultivo del algodón.....	208
2. Algodón genéticamente modificado tolerante a herbicidas.....	209
2.1. Algodón tolerante a glifosato.	209
2.2. Algodón tolerante a glufosinato.	210
2.3. Resistencia de maleza a herbicidas.....	215
2.4. Alternativas al uso de algodón tolerante a herbicidas.	217
3. Plagas del cultivo de algodón.....	223
3.1. Complejo bellotero (<i>Helicoverpa zea</i>)/ tabacalero (<i>Heliothis virescens</i>).....	223
3.2. Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>).	224
3.3. Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>).	224
3.4. Gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>).	225
3.5. Mosquita blanca (<i>Bemisia argentifolii</i>).	226
3.6. Picudo del algodón (<i>Anthonomus grandis</i> Boheman).	226
3.7. Conchuela del algodón (<i>Chlorochroa ligata</i> Say).	227
3.8. Chinche Lygus (<i>Lygus</i> spp.).	227
3.9. Trips.	228



3.10. Pulgón del algodón (<i>Aphis gossypii</i>).....	229
4. Algodón genéticamente modificado resistente a insectos.	229
5. Resistencia de insectos.	232
6. Alternativas al uso de algodón GM resistente a insectos.	234
7. Literatura consultada.....	235
VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O DE BIORREMEDIACIÓN.....	238
VIII. LA PROPUESTA DE VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA.	238
INFORMACIÓN ADICIONAL.	238
a) La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte.	238
1. Importación y almacenamiento de la semilla.	238
2. Movilización de la semilla.	240
b) El diseño experimental que se llevarán a cabo durante la liberación en etapa experimental.	241
REFERENCIAS.....	241



LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de especies de <i>Gossypium</i> en México.....	18
Cuadro 2. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México.	22
Cuadro 3. Resumen de los genes insertados en los eventos parentales del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	26
Cuadro 4. Resumen de los elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	29
Cuadro 5. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México.	38
Cuadro 6. Sondas utilizadas en el análisis de hibridación <i>Southern Blot</i> del algodón GHB614.	48
Cuadro 7. Fragmentos de hibridación esperados y observados para el análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614.	49
Cuadro 8. Sondas utilizadas en el análisis de hibridación <i>Southern blot</i> del algodón T304-40.	50
Cuadro 9. Sondas utilizadas en el análisis de hibridación <i>Southern blot</i> del algodón GHB119.....	51
Cuadro 10. Niveles de expresión de la proteína Cry1Ab en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	53
Cuadro 11. Niveles de expresión de la proteína Cry2Ae en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	54
Cuadro 12. Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa19 en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	54
Cuadro 13. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	55
Cuadro 14. Niveles de expresión de la proteína PAT/ <i>bar</i> en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	55
Cuadro 15. Niveles de expresión de la proteína APH4 en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	56
Cuadro 16. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTEM2.....	57
Cuadro 17. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTDL008.	59
Cuadro 18. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTEM12.....	61
Cuadro 19. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pCOT1.....	63
Cuadro 20. Análisis de segregación del evento GHB614.	66
Cuadro 21. Análisis de segregación del algodón T304-40 x GHB119.....	68
Cuadro 22. Datos de segregación de la progenie del evento COT102.	68
Cuadro 23. Niveles de expresión de la proteína Cry1Ab en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	69
Cuadro 24. Niveles de expresión de la proteína Cry2Ae en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	70
Cuadro 25. Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa19 en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	70
Cuadro 26. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	71
Cuadro 27. Niveles de expresión de la proteína PAT/ <i>bar</i> en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	71
Cuadro 28. Niveles de expresión de la proteína APH4 en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	72



Cuadro 29. Resumen de los resultados de hibridación que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón GHB614.	76
Cuadro 30. Resumen de los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación, que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón T304-40.	80
Cuadro 31. Resumen de los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación, que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón GHB119.	83
Cuadro 32. Elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.	106
Cuadro 33. Resumen de los genes de selección utilizados para la obtención de los eventos parentales del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	120
Cuadro 34. Superficie y cantidad de semilla a importar y/o movilizar para el programa experimental de algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus durante el ciclo PV-2016.....	134
Cuadro 35. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus en etapa experimental en Chihuahua y Comarca Lagunera.	135
Cuadro 36. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus en etapa experimental en Tamaulipas Sur.....	137
Cuadro 37. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México.	137
Cuadro 38. Niveles de expresión de la proteína Cry1Ab en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	154
Cuadro 39. Niveles de expresión de la proteína Cry2Ae en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	155
Cuadro 40. Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa19 en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	155
Cuadro 41. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	156
Cuadro 42. Niveles de expresión de la proteína PAT/ <i>bar</i> en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	156
Cuadro 43. Niveles de expresión de la proteína APH4 en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.....	157
Cuadro 44. Ubicación de los ensayos de campo para la evaluación agronómica y fenotípica del algodón GLTC.	159
Cuadro 45. Descripción de tratamientos para la evaluación agronómica y fenotípica del algodón GLTC.....	160
Cuadro 46. Resumen de características de sanidad del cultivo de algodón GLTC y convencional.	161
Cuadro 47. Resumen de características agronómicas evaluadas en el algodón GLTC y convencional.....	161
Cuadro 48. Resumen de datos obtenidos del mapeo final de plantas de algodón GLTC y convencional.....	162
Cuadro 49. Resumen de características de bellota y rendimiento de algodón GLTC y convencional.	162
Cuadro 50. Resumen de características de calidad de fibra de algodón GLTC y convencional. ...	163
Cuadro 51. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco.....	166
Cuadro 52. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco.....	167
Cuadro 53. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México.	170



Cuadro 54. Manejo agronómico del cultivo de algodón en Chihuahua - Comarca Lagunera.	183
Cuadro 55. Manejo agronómico del cultivo de algodón en Tamaulipas.	184
Cuadro 56. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco.....	195
Cuadro 57. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco.....	197
Cuadro 58. Superficie sembrada con algodón en Estados Unidos 2013 – 2014.....	198
Cuadro 59. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodón (PLM, 2006).....	206
Cuadro 60. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón COT102 (OECD: SYN-IR1Ø2-7).	207
Cuadro 61. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón GHB614 (OECD: BCS-GHØØ2-5).	208
Cuadro 62. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón T304-40 x GHB119 (OECD: BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8).	208
Cuadro 63. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.	212
Cuadro 64. Espectro de control de maleza del herbicida glufosinato de amonio.	213
Cuadro 65. Espectro de control de maleza del herbicida glifosato.....	214
Cuadro 66. Consumo de combustible por el uso de tractor por tipo de labranza en Estados Unidos.	215
Cuadro 67. Ingrediente activo, formulación, dosis, categoría toxicológica y grupo químico de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.....	219
Cuadro 68. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.	220
Cuadro 69. Ventajas y desventajas de los métodos de manejo de maleza.....	223
Cuadro 70. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.	231
Cuadro 71. Los 20 artrópodos más importantes, para los cuales se han registrado casos de resistencia en la agricultura y la salud pública.	232
Cuadro 72. Ingrediente activo, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos plaga en algodón (PLM, 2014).	234



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de especies de algodón silvestre en México.	20
Figura 2. Mapa de distribución del género <i>Gossypium</i> en México (REMIB-CONABIO, 2006).	21
Figura 3. Productos de PCR generados a través del inserto en algodón GHB614.	42
Figura 4. Esquema del <i>locus</i> correspondiente al evento T304-40 y del <i>locus</i> de pre-inserción.....	43
Figura 5. Localización de las regiones de unión del DNA insertado en el algodón T304-40.	43
Figura 6. Esquema del <i>locus</i> transgénico en el algodón GHB119 comparado con el T-DNA del vector pTEM12 y el sitio de pre-inserción en el algodón convencional Coker 312.....	44
Figura 7. Esquema del T-DNA del evento GHB614 mostrando la estrategia de hibridación.	48
Figura 8. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda Ph4a748At.....	49
Figura 9. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda intron1 h3At+TPotp C.	49
Figura 10. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda <i>2mepsps</i>	49
Figura 11. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda 3'histonAt.....	49
Figura 12. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda del T-DNA completo.....	49
Figura 13. Dibujo esquemático del T-DNA del evento T304-40 mostrando la estrategia de hibridación.....	50
Figura 14. Esquema del inserto en el algodón T304-40.....	50
Figura 15. Resultados del análisis de hibridación <i>Southern blot</i> con diferentes sondas para el evento T304-40.....	51
Figura 16. Resultados del análisis de hibridación <i>Southern blot</i> con diferentes sondas para el evento T304-40 (continuación).....	51
Figura 17. Esquema del T-DNA del evento GHB119 mostrando la estrategia de hibridación.	52
Figura 18. Resultados del análisis de hibridación <i>Southern blot</i> con diferentes sondas para el evento GHB119.	52
Figura 19. Resultados del análisis de hibridación <i>Southern blot</i> con diferentes sondas para el evento GHB119 (continuación).	52
Figura 20. Mapa del vector pTEM2.....	57
Figura 21. Diagrama del T-DNA del plásmido pTDL008.....	57
Figura 22. Mapa del plásmido pTDL008.....	59
Figura 23. Diagrama del T-DNA del plásmido pTDL008.....	59
Figura 24. Mapa del plásmido pTEM12.....	60
Figura 25. Diagrama del T-DNA del plásmido pTEM12.	60
Figura 26. Mapa del plásmido pCOT1.....	63
Figura 27. Diagrama del T-DNA del plásmido pCOT1.	63
Figura 28. Diagrama del desarrollo del evento GHB614.....	64
Figura 29. Diagrama del desarrollo del algodón GHB614.....	65
Figura 30. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40.	66
Figura 31. Diagrama del desarrollo del algodón GHB119.....	66
Figura 32. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40 x GHB119 (TwinLink™).	68
Figura 33. Mapa de las generaciones del evento COT102 utilizadas para estudios de estabilidad genética.	68
Figura 34. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102.....	69
Figura 35. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102.....	74
Figura 36. Esquema del vector pTEM2 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.	76



Figura 37. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT001 y T-DNA (PT006).	77
Figura 38. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT002 y T-DNA (PT006).	77
Figura 39. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT003 y T-DNA (PT006).	77
Figura 40. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT004 y T-DNA (PT006).	77
Figura 41. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT005 y T-DNA (PT006).	78
Figura 42. Esquema del vector pTEM2 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.	80
Figura 43. Resultados del análisis <i>Souther blot</i> – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón T304-40.	80
Figura 44. Resultados del análisis <i>Souther blot</i> – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón T304-40 (continuación).	80
Figura 45. Esquema del vector pTEM12 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la estrategia de hibridación utilizada.	83
Figura 46. Resultados del análisis <i>Southern blot</i> – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón GHB119.	83
Figura 47. Resultados del análisis <i>Southern blot</i> – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón GHB119 (continuación).	83
Figura 48. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS.	85
Figura 49. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry1Ab codificada por el gen <i>cry1Ab</i> de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i> .	86
Figura 50. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry2Ae codificada por el gen <i>cry2Ae</i> de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i> .	86
Figura 51. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína PAT codificada por el gen <i>bar</i> de la bacteria <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .	86
Figura 52. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Vip3Aa19 codificada por el gen <i>vip3Aa19</i> de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa AB88.	87
Figura 53. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína APH4 codificada por el gen <i>aph4</i> de la bacteria <i>Escherichia coli</i> .	87
Figura 54. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS.	88
Figura 55. Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> .	91
Figura 56. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.	94
Figura 57. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.	95
Figura 58. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS.	97
Figura 59. Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> .	100
Figura 60. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.	103
Figura 61. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.	104
Figura 62. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.	121



Figura 63. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.	122
Figura 64. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM2 indicando la el sitio de restricción de la enzima <i>EcoRV</i> y la posición de la sonda utilizada.	124
Figura 65. Estabilidad del evento GHB614 generación T3.	124
Figura 66. Estabilidad del evento GHB614 generación T4.	124
Figura 67. Estabilidad del evento GHB614 generación T5.	124
Figura 68. Estabilidad del evento GHB614 generación T6.	124
Figura 69. Estabilidad del evento GHB614 generación BC ₂ F ₂	124
Figura 70. Esquema del T-DNA del plásmido pTDL008 indicando los sitios de restricción de la enzima <i>EcoRV</i> y la posición de la sonda utilizada.	124
Figura 71. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0466 (cultivar 983050 – 99MS88).	125
Figura 72. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0467 (cultivar Coker 315).	125
Figura 73. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0468 (cultivar 9740).	125
Figura 74. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0469 (cultivar 97201-16).	125
Figura 75. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000740 (generación BC ₂ F ₂).	125
Figura 76. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000741 (generación BC ₂ F ₁).	125
Figura 77. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000742 (generación BC ₁ F ₁).	125
Figura 78. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000743 (generación F ₁).	125
Figura 79. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM12 indicando los sitios de restricción de la enzima <i>EcoRV</i> y la posición de la sonda utilizada.	126
Figura 80. Estabilidad del evento GHB119 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GC03 (cultivar Coker 312).	126
Figura 81. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación F ₁).	126
Figura 82. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC ₁ F ₁).	126
Figura 83. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC ₂ F ₁).	126
Figura 84. Polígono propuesto para la liberación de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus en etapa experimental en la región agrícola de Chihuahua, Coahuila y Durango.	134
Figura 85. Polígono propuesto para la liberación de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus en etapa experimental en la región agrícola de Tamaulipas Sur.	135
Figura 86. Distribución puntual de <i>G. hirsutum</i> y <i>G. barbadense</i> con relación al polígono de liberación propuesto para la liberación de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus.	138
Figura 87. Municipios comprendidos dentro de los polígonos de liberación de algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus.	143
Figura 88. Distritos de Desarrollo Rural (DDR) comprendidos dentro de los polígonos de liberación de algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus.	144
Figura 89. Tipo de agricultura en los polígonos de liberación propuestos.	145
Figura 90. Áreas Naturales Protegidas aledañas a los polígonos de liberación.	146



Figura 91. Ecorregiones Nivel IV presentes dentro del polígono de liberación Chihuahua-Coahuila y Durango.	147
Figura 92. Ecorregiones Nivel IV presentes dentro del polígono de liberación Tamaulipas Sur. ...	148
Figura 93. Ruta de movilización de Cd. Juárez a Delicias, Chih.	149
Figura 94. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM2 indicando la el sitio de restricción de la enzima <i>EcoRV</i> y la posición de la sonda utilizada.	150
Figura 95. Estabilidad del evento GHB614 generación T3.	150
Figura 96. Estabilidad del evento GHB614 generación T4.	150
Figura 97. Estabilidad del evento GHB614 generación T5.	150
Figura 98. Estabilidad del evento GHB614 generación T6.	151
Figura 99. Estabilidad del evento GHB614 generación BC ₂ F ₂	151
Figura 100. Esquema del T-DNA del plásmido pTDL008 indicando los sitios de restricción de la enzima <i>EcoRV</i> y la posición de la sonda utilizada.	151
Figura 101. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0466 (cultivar 983050 – 99MS88).	151
Figura 102. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0467 (cultivar Coker 315).	151
Figura 103. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0468 (cultivar 9740).	151
Figura 104. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0469 (cultivar 97201-16).	151
Figura 105. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000740 (generación BC ₂ F ₂).	152
Figura 106. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000741 (generación BC ₂ F ₁).	152
Figura 107. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000742 (generación BC ₁ F ₁).	152
Figura 108. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000743 (generación F ₁).	152
Figura 109. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM12 indicando los sitios de restricción de la enzima <i>EcoRV</i> y la posición de la sonda utilizada.	152
Figura 110. Estabilidad del evento GHB119 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GC03 (cultivar Coker 312).	152
Figura 111. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación F ₁).	152
Figura 112. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC ₁ F ₁).	153
Figura 113. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC ₂ F ₁).	153
Figura 114. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.	180
Figura 115. Almacén de Bayer de México ubicado en Delicias, Chih.	188
Figura 116. Condiciones de almacenamiento y seguridad del almacén.	189
Figura 117. Regiones productoras de algodón de los Estados Unidos (<i>Cotton belt</i>).	199
Figura 118. Principales tipos climáticos de Estados Unidos.	199
Figura 119. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a herbicidas en Estados Unidos, Australia, Argentina y Sudáfrica 1997-2013 (Brookes y Barfoot, 2015).	212



Figura 120. Incremento cronológico en el número de malezas resistentes a herbicidas pertenecientes a distintos grupos (Heap, 2015).	217
Figura 121. Número de especies resistentes a herbicidas por cultivo (Heap, 2015).	221
Figura 122. Número de especies resistentes a herbicidas individuales (Heap, 2015).	222
Figura 123. Gusano bellotero (<i>Helicoverpa zea</i>).	224
Figura 124. Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>).	224
Figura 125. Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>).	225
Figura 126. Gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>).	225
Figura 127. Mosquita blanca (<i>Bemisia argentifolii</i>).	226
Figura 128. Picudo del algodnero (<i>Anthonomus grandis</i>).	227
Figura 129. Conchuela del algodón (<i>Chlorochroa ligata</i> Say).	227
Figura 130. Chinche Lygus (<i>Lygus</i> spp.).	228
Figura 131. Daño por trips en el cultivo de algodón.	229
Figura 132. Pulgón del algodón (<i>Aphis gossypii</i>).	229
Figura 133. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a herbicidas en Estados Unidos, Australia, Argentina y Sudáfrica 1997-2013 (Brookes y Barfoot, 2015).	231
Figura 134. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.	240



I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM.

a) Identificador único del evento de transformación.

Los identificadores únicos OECD para el algodón GHB614 (**BCS-GHØØ2-5**) x T304-40 (**BCS-GHØØ4-7**) x GHB119 (**BCS-GHØØ5-8**) x COT102 (**SYN-IR1Ø2-7**), han sido previamente asignados y se podrá tener acceso a su estatus regulatorio en relación a la seguridad de los mismos para el consumo humano y/o animal, y la respectiva información relevante de bioseguridad en los sitios de internet de Biosafety Clearing House¹, la Base de Datos Biotrack de la OCDE² y en la Base de Datos CERA³.

Otras designaciones:

Algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102
Algodón BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7
Algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus
Algodón GlyTol™ TwinLink™ COT102
Algodón Glytol™ Twinlink™ VIPCOT™
Algodón GLTC

El algodón GLTC combina la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ab (T304-40), Cry2Ae (GHB119) y Vip3Aa19 (COT102) para un control más eficiente de insectos lepidópteros plaga del algodón y representa una nueva herramienta para prevenir el desarrollo de resistencia en los insectos. Asimismo, combina la expresión de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (T304-40/ GHB619) que confieren tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, permitiendo el uso de dos mecanismos de acción herbicida para un manejo más eficiente de la maleza en el cultivo del algodón, esta combinación de mecanismos de acción es particularmente importante para el manejo y prevención de resistencia de las especies de maleza a los herbicidas.

*El evento **COT102 (SYN-IR1Ø2-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.*

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

La distribución del genero *Gossypium* en México ha sido ampliamente estudiada y caracterizada. Los reportes encontrados en la literatura científica (Fryxell, 1979; Fryxell, 1984; Talipov *et al.*, 1995; Palomo, 1996; Ulloa *et al.*, 2006) y la información disponible en instituciones como el Servicio de Investigación Agrícola de los Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), el Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología de la UNAM y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), reportan alrededor de 15 especies de *Gossypium* para México (**Cuadro 1**).

¹ <http://bch.biodiv.org/>

² <http://www2.oecd.org/biotech/>

³ http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database



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

Especie	Ubicación Estado: Localidades y/o Municipios
<i>G. aridum</i>	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, Cofradía y Culiacán. Veracruz: Actopan. Puebla: Tecamatlán, Jolalpan, San Pedro de las Palmas, Tecuautitlán San Martín.
<i>G. armourianum</i>	Baja California: Golfo de California e Isla San Marcos.
<i>G. davidsonii</i>	Baja California: Arroyo Salado, ribera del Río La Purísima, Sierra de la Giganta, Los Cabos, Santa Anita y La Paz. Sonora: Guaymas.
<i>G. gossypoides</i>	Oaxaca: Santa Ana, Xishilo Cuicallán, San Bartolo Yautepec, Tlacolula y Tehuantepec.
<i>G. harknessii</i>	Baja California: Cieneguita, Isla Margarita, Isla Montserrat, Loreto, La Paz, Isla Coronado, Isla del Carmen y Agua Grande.
<i>G. hirsutum</i>	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.
<i>G. lanceolatum</i>	Baja California: Isla Socorro. Guerrero: Acapulco, José Azueta, Coyuca de Benítez, Coyuca de Catalán y Zihuatanejo. Colima: El Huerto e Isla Socorro.
<i>G. laxum</i>	Guerrero: Chilpancingo, Zumpango del Río y al oeste de Milpillas.



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

Fuente: Fryxell (1979); Herbario Nacional (MEXU) (1998) del Instituto de Biología de la UNAM.

Figura 1. Distribución de especies de algodón silvestre en México.

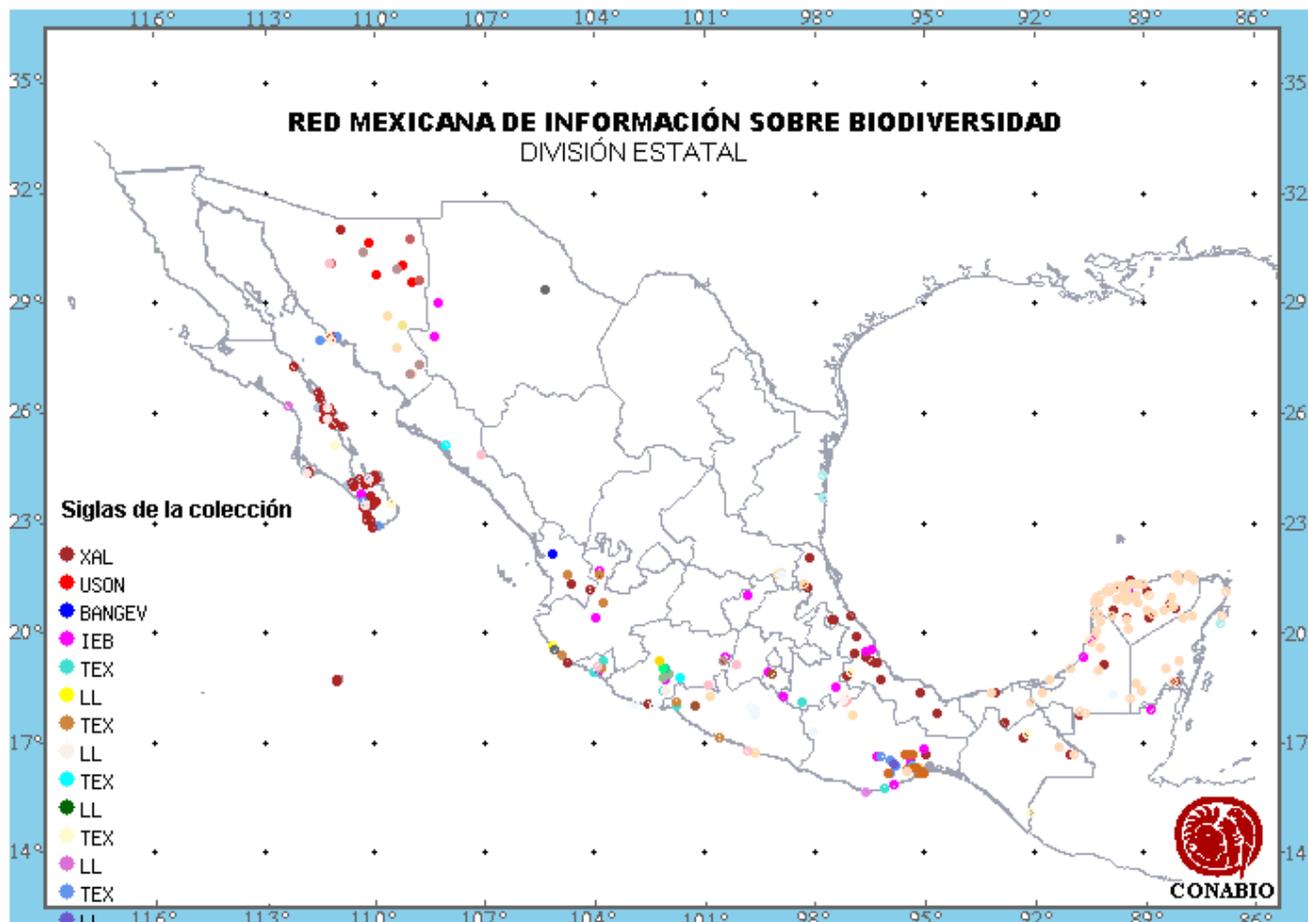


Fuente: Fryxell (1979); Herbario Nacional "MEXU" (1998) del Instituto de Biología de la UNAM.

Adicionalmente, se realizó una búsqueda en la **Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB)**⁴, donde se obtuvo información de una serie de colectas realizadas para el género *Gossypium* en México. La búsqueda también permitió generar un mapa de distribución de dichas colectas que muestra y corrobora la información anterior (Fryxell, 1979; MEXU, 1998), que indica que no existe una distribución de especies relacionadas con el algodón cultivado en las regiones algodoneras del norte de México (Figura 2).

⁴ La Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) es un sistema computarizado de información biológica (incluye bases de datos de tipo curatorial, taxonómico, ecológico, cartográfico, bibliográfico, etnobiológico, de uso y catálogos sobre recursos naturales y otros temas), basado en una organización académica interinstitucional descentralizada e internacional formada por centros de investigación y de enseñanza superior, públicos y privados, que posean tanto colecciones biológicas científicas como bancos de información. La REMIB, es una red interinstitucional que comparte información biológica. Está constituida por nodos, formados por los centros de investigación que albergan las colecciones científicas.

Figura 2. Mapa de distribución del género *Gossypium* en México (REMIB-CONABIO, 2006).



Fuente: http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_distribucion.cgi

Bases de datos consultadas:

- Herbario XAL del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-XAL)
- Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
- Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH)
- Herbario de la Universidad de Texas - Austin, EUA (LL, TEX)
- Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-BAJIO) (AVISO)
- Herbario de la Universidad de Sonora, México (USON)
- Árboles y Arbustos Nativos para la Restauración Ecológica y Reforestación de México (IE-DF, UNAM)
- Árboles de la Península de Yucatán, Flora del Distrito de Tehuantepec, Oaxaca y la Familia Asteraceae en México (IBUNAM)
- Herbario del CIBNOR
- Herbario Weberbauer de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL)
- Flora Vasculare de la Sierra de San Pedro Mártir, Baja California, México (UABC)
- Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México (FES-I, UNAM)



- Herbario de la Universidad Autónoma de Baja California, México (UABC)
- Herbario de la Universidad de Arizona, EUA (ARIZ)
- Herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, México (CICY)
- Herbario Kew del Real Jardín Botánico (RBGKEW)
- Ejemplares tipo de plantas vasculares del Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
- Estudio Florístico de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, México (ENCB, IPN)
- La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de Las Salinas, Puebla, México (FES-I, UNAM)
- Herbario de Geo. B. Hinton, México
- Colección de ejemplares tipo del Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX)

c) Existencia de especies sexualmente compatibles.

No existen especies sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*Gossypium hirsutum*) en el área de liberación propuesta. De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), se reportan las siguientes especies de *Gossypium* para la región Norte de México (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies de *Gossypium* reportadas en la literatura para el Norte de México.

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

Las especies silvestres reportadas para México son diploides ($2n=2x=26$) y, por lo tanto, son sexualmente incompatibles con el algodón cultivado *G. hirsutum* el cual es una especie alotetraploide ($2n=4x=52$). En el caso de se pudieran encontrar especies silvestres cercanas a las regiones agrícolas y en el improbable caso de que pudieran quedar en contacto con polen de *G. hirsutum* (tetraploide), el producto de la fecundación sería triploide y durante la metafase de la meiosis no se podría realizar el apareamiento de homólogos, imposibilitando así la formación de un cigoto fértil por la disparidad de los sistemas genéticos (Stewart, 1995; Wendel *et al.*, 2010; Kantartzi, 2010). A esta barrera genética se debe incluir la barrera temporal para el entrecruzamiento ya que no se presenta coincidencia en los períodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales. Por otra parte, la distribución de la especie alotetraploide *G. barbadense* se encuentra limitada principalmente al sureste de México lejos de las zonas productoras de algodón comercial en el norte de la República Mexicana.



d) Hábitats de persistencia o proliferación.

El algodón es un cultivo ampliamente distribuido a nivel global en las regiones áridas y semiáridas con climas cálidos y semicálidos. Las regiones donde se puede establecer el cultivo se ubican en un rango de 0 - 600 msnm, requiere de una buena precipitación (700 - 1300 mm/ciclo de cultivo) o disponibilidad de agua para riego. La temperatura mínima y máxima para el desarrollo del cultivo es de 12.8°C y 30°C, en general se requiere una temperatura mayor a 18°C para obtener buenos rendimientos. El cultivo del algodón requiere de suelos profundos con buen drenaje de tipo migajón a franco-arcilloso y franco limoso con un pH óptimo de 5.6 (Ruiz-Corral *et al.*, 1999).

A partir de los resultados de estudios de equivalencia agronómica se ha concluido que el algodón GlyTol™TwinLink™ Plus no es diferente al algodón convencional, por lo que se espera que también su distribución sea similar a las variedades de empleo agrícola con las que comparte germoplasma.

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 GlyTol™TwinLink™ Plus 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 disponibilidad de agua, la temperatura y la altitud son tres factores dominantes que influyen el establecimiento y desarrollo de este cultivo.

Distribución:

El algodón es un cultivo originario de las regiones tropicales de América, África, Asia Suroriental y Australia, su distribución abarca de los 42° LN a los 32°LS. Este cultivo se adapta a las regiones áridas y semiáridas con climas cálidos y semicálidos. Su ciclo vegetativo dura alrededor de 135 a 180 días, dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales. Es una planta de tipo fotosintético C₃⁵.

Fotoperiodo:

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

Altitud:

0-600 m.

Requerimientos hídricos:

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

Humedad ambiental:

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

⁵ En las plantas C₃ el CO₂ entra en el ciclo de Calvin y se fija a la RuDP produciendo dos moléculas de PGA (3 C). Los estomas se abren durante el día.



Temperatura:

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

Luz:

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

Requerimientos de suelo.

Textura de suelo:

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

Profundidad de suelo:

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

Salinidad:

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

pH:

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

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

1. Organismo receptor.

El organismo receptor para los eventos GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 es la planta de algodón (*Gossypium hirsutum* L.). El algodón es un miembro de la familia Malvaceae, a continuación se presenta la clasificación taxonómica del algodón de acuerdo con NRCS (Natural Resources Conservation Service-United States Department of Agriculture, <http://plants.usda.gov>).

Reino	Plantae - Vegetal
Subreino	Tracheobionta – Plantas vasculares
Súperdivisión	Spermatophyta – Plantas con semillas
División	Magnoliophyta – Plantas con flores
Clase	Magnoliopsida – Dicotiledóneas
Subclase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Gossypium</i> L. – algodón cultivado
Especie	<i>Gossypium hirsutum</i> L. – algodón cultivado

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov>).



Las especies silvestres y cultivadas del género *Gossypium* pertenecen a la familia Malvaceae. Este género contiene 50 especies con un número cromosómico básico de 13. De las especies descritas, 45 son diploides ($2n=2x=26$) y se agrupan en siete genomas designados como **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, y **G**. Las especies diploides con los genomas **A**, **B**, **E**, o **F** son originarias de África o Asia y se les conoce como especies del Viejo Mundo, las cuales están estrechamente relacionadas. Las especies diploides con los genomas **C** o **G** son originarias de Australia. Las especies diploides que contienen el genoma **D** son originarias del hemisferio occidental y se les conoce como especies del Nuevo Mundo. Los cromosomas en el genoma **D** son más pequeños que los cromosomas de los otros genomas (Milton and Allen, 1995).

Además de las 45 especies diploides, existen cinco especies alotetraploides ($2n=4x=52$) originarias del Nuevo Mundo, de las cuales cuatro son originarias del continente Americano y una de Hawaii. Las especies alotetraploides contienen la combinación de los genomas **AADD** y tienen 26 cromosomas largos y 26 cromosomas chicos, aunque existe algún traslape en tamaño entre los cromosomas de los genomas **A** y **D**. El origen genético de las especies alotetraploides fue demostrado experimentalmente cruzando *G. arboreum* (genoma **A**), especie diploide cultivada en la India, y *G. thurberi* (genoma **D**), especie diploide silvestre de América, y duplicando los cromosomas del híbrido estéril con colchicina. El híbrido anfidiplóide⁶ (**AADD**, $2n=4x=52$) produjo híbridos fértiles cuando fue cruzado con especies tetraploides americanas.

Dos especies diploides y dos tetraploides de *Gossypium* son las especies cultivadas actualmente:

- *G. herbaceum* L., ($2n=2x=26$) genoma **A**, cromosomas largos,
- *G. arboreum* L., ($2n=2x=26$) genoma **A**, cromosomas largos,
- *G. hirsutum* L., ($2n=4x=52$) genoma **AD**, 26 cromosomas chicos y 26 cromosomas largos, y
- *G. barbadense* L., ($2n=4x=52$) genoma **AD**, 26 cromosomas chicos y 26 cromosomas largos.

G. hirsutum es la principal especie de algodón cultivado y representa aproximadamente el 90% de la producción mundial de fibra y aceite de algodón.

2. Organismos donadores para los eventos GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Los organismos donadores de los genes presentes en el evento combinado mediante cruzamiento convencional algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se presentan en el

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



Cuadro 3.



Cuadro 3. Resumen de los genes insertados en los eventos parentales del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Evento	Gen	Organismo donador	Producto del gen	Función
GHB614	<i>2mepsps</i>	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (mEPSPS) tolerante a glifosato	Disminuye la afinidad con el glifosato y, por lo tanto, aumenta la tolerancia a este herbicida
T304-40	<i>cry1Ab</i>	Bacteria (<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>)	Delta-endotoxina Cry1Ab	Confiere resistencia a insectos lepidópteros al dañar su intestino medio
	<i>bar</i>	Bacteria (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)	Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación
GHB119	<i>cry2Ae</i>	Bacteria (<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i>)	Delta-endotoxina Cry2Ae	Confiere resistencia a insectos lepidópteros al dañar su intestino medio
	<i>bar</i>	Bacteria (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)	Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación
COT102	<i>vip3Aa19</i>	Bacteria (<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa AB88)	Proteína vegetativa insecticida Vip3Aa19	Confiere resistencia a insectos lepidópteros al dañar su intestino medio
	<i>aph4 (hptI)</i>	Bacteria (<i>Escherichia coli</i>)	Enzima hygromycin-B phosphotransferase (hph)	Marcador de selección mediante resistencia al antibiótico Higromicina B

3. Identificación de los organismos donadores para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

3.1. Maíz (*Zea mays*).

El maíz es uno de los granos de mayor cultivo en todo el mundo, motivo por el cual se puede decir que tanto la semilla como cualquier derivado cuenta con un historial de uso seguro en alimentación/uso humana y animal. Los pueblos indígenas del hemisferio occidental han utilizado el grano de maíz desde tiempos ancestrales. El maíz se cultiva comercialmente en más de 100 países, con un total cosechado de más de 590 millones de toneladas métricas. Los principales productores de maíz son Estados Unidos, China, Brasil, México, Francia y Argentina. El maíz se cultiva principalmente por sus granos, los cuales en su mayor parte se someten a un proceso de refinado para obtener productos utilizados en una amplia variedad de artículos alimenticios, médicos e industriales.

El maíz es un producto alimenticio básico en México y el consumo nacional *per capita* es de 187 kg (García, 2012). El 68% de la producción de maíz en México se consume directamente como alimento, en comparación con el promedio global de 21%. Bourges (2002), en un estudio sobre dietas mexicanas reportó que el grano de maíz, consumido en forma de tortillas, constituía un promedio del 59% de la ingesta de fuentes de energía y el 39% de la ingesta de proteínas.



Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Liliopsida (monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae/Gramineae
Género	Zea L.
Especie	Zea mays L.

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

3.2. *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva, facultativa anaeróbica que forma inclusiones de proteína adyacente a la endospora. Las subespecies de *B. thuringiensis* pueden sintetizar más de una inclusión parasporal. Estas inclusiones están formadas por diferentes proteínas cristal insecticida (PCI) (Soberon y Bravo, 2007).

Los cristales o el complejo de espora/cristal de un Bt esporulado deben ser ingerido por las larvas de insectos susceptibles. La eficacia de los cristales en el intestino medio del insecto depende de la solubilización de los cristales, de la conversión de la protoxina a la toxina biológicamente activa por las enzimas proteolítica, de los receptores específicos ensamblado por el dominio terminal-C de la toxina activa y la formación de un poro por el dominio terminal-N con el rompimiento de las células epiteliales. La germinación de la espora y la proliferación de las células vegetativas dentro del homocelo del insecto podrían resultar en una septicemia contribuyendo a la muerte del insecto. Los receptores ensamblados por el cristal es el principal determinante de la especificidad del hospedero debido a la existencia de diferentes cristales presentes en cada una de las cepas de Bt.

Un gran número de subespecies de *B. thuringiensis* se han aislados de larvas muertas principalmente del Coleóptera, Díptera y Lepidóptera, pero muchas de las subespecies se han aislados del suelo, de las superficies de hojas y de otros hábitats. Los insectos muertos frecuentemente contienen grandes cantidades de esporas y cristales que pueden entrar al ambiente. Las subespecies de Bt que son activas contra coleópteros y lepidópteros están asociadas con el suelo y la superficie de hojas, mientras que las subespecies activas contra dípteros se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos. En el ambiente, las esporas persisten y el crecimiento vegetativo podría ocurrir cuando las condiciones son favorables y los nutrientes están disponibles.

Reino	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)



3.3. *Streptomyces hygrosopicus*.

Streptomyces hygrosopicus es una bacteria en forma de bacilo, gram positiva, aeróbica, filamentososa, formadora de bio-películas y habitante natural del suelo. Pertenece al grupo de los Actinomycetes y son bacterias que comparten muchas características con los hongos. Estas bacterias crecen usualmente como filamentos (cadenas de células) que usualmente se ramifican para formar redes de filamentos en el suelo (micelio). En la punta de los filamentos se desarrollan cadenas de esporas de longitud indefinida. Estas bacterias son las responsables del olor a humedad del suelo. Algunas bacterias del género *Streptomyces* producen antibióticos tales como la estreptomycin. En el caso de la especie *Streptomyces hygrosopicus* produce el antibiótico milbemicina, el cual es usado como insecticida y también para controlar algunas infecciones parasitarias en animales. Estas bacterias también forman bio-películas, las cuales son acumulaciones de bacterias en ambientes acuosos formadas por secreciones de materiales viscosos y mucilaginosos que proveen a la bacteria de un medio para adherirse a la mayoría de las superficies. *S. hygrosopicus* tiene una amplia distribución en la naturaleza y no se considera patógeno para humanos, animales o plantas (OECD, 1999).

Reino	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Orden	Actinomycetales
Familia	Streptomycetaceae
Género	<i>Streptomyces</i>
Especie	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)

3.4. *Escherichia coli*.

El organismo donador del gen aph4 utilizado como marcador de selección es la bacteria *Escherichia coli* cepa K12. *E. coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, la cual comprende un grupo relativamente homogéneo de bacterias en forma de bacilo, Gram-negativas, aeróbicas y facultativas. Las bacterias del género *Escherichia* son ubicuas en el ambiente y son habitantes comunes del tracto digestivo de los vertebrados, incluyendo los humanos (Souza *et al.*, 2001).

La cepa de laboratorio K12 de *E. coli* ha sido intensamente utilizada como un organismo modelo en gran cantidad de estudios y tiene un largo historial de uso seguro, es particularmente utilizada en sistemas de producción comercial de proteínas tanto en la industria farmacéutica, como en la industria alimenticia (Bogosian and Kane 1991).

Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>Escherichia coli</i> cepa K12

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)



3.5. Historial de uso seguro de los organismos donantes.

Las especies donantes de los genes *2mepsps*, *cry1Ab*, *cry2Ae*, *vip3Aa19*, *bar* y *aph4* son plantas utilizadas comúnmente como alimento humano o animal, o bien bacterias que habitan de manera natural en el suelo o en el intestino humano y que han sido utilizadas como fuentes de genes para mejorar los atributos de varios cultivos en los últimos 20 años, sin que se hayan encontrado evidencias de efectos patogénicos, tóxicos o alergénicos para humanos y animales (www.isaaa.org; <https://bch.cbd.int/>).

Las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Streptomyces hygroscopicus* no son utilizadas como alimento humano ni como alimento o suplemento en nutricional animal. Ninguna de las bacterias utilizadas como donantes de genes tiene antecedentes de ser tóxicas para humanos o animales (OECD, 2007; OECD, 1999). Adicionalmente, es importante considerar que para la obtención del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 no se utilizan bacterias completas sino solo uno de sus genes. Los estudios bio-informáticos y biológicos realizados demuestran que ninguna de las proteínas codificadas por los genes utilizados tiene efectos potencialmente tóxicos ni alergénicos.

4. Identificación de los organismos donadores de secuencias reguladoras.

Cada gen transferido al algodón requiere de secuencias reguladoras que permitan su transcripción en RNA y su posterior traducción en forma óptima. Las secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes introducidos en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se presentan en el

Cuadro 4. Aunque algunas secuencias reguladoras se derivan de patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV), virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV), estas secuencias no tienen capacidad de inducir enfermedades en el algodón.

Cuadro 4. Resumen de los elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Evento	Gen	Secuencia reguladora	Organismo donador de la secuencia reguladora	Función
GHB614	<i>2mepsps</i>	Ph4a748At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Promotor constitutivo
		TPotp C	<i>Zea mays/ Helianthus annuus</i>	Péptido de tránsito que dirige la translocación de la proteína a los cloroplastos
		3'histonAt	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción)
T304-40	<i>cry1Ab</i>	5'e1-Ps7s7	Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV)/ <i>Oriza sativa</i>	Promotor
		3'me1	<i>Flaveria bidentis</i>	Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción)
	<i>bar</i>	P35S3	Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)	Promotor constitutivo
		3'nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Señal de poliadenilación (terminación de la



Evento	Gen	Secuencia reguladora	Organismo donador de la secuencia reguladora	Función
				transcripción)
GHB119	cry2Ae	P35S3	Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)	Promotor constitutivo
		TPssuAt	<i>Arabidopsis thaliana/ Petunia hybrida</i>	Péptido de tránsito
		3'35s	Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)	Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción)
	bar	Pcsvmv XYZ	Virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV)	Promotor constitutivo
		3'nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción)
COT102	vip3Aa19	Act2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Promotor constitutivo
		3'nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción)
	aph4 (hptI)	Ubq3int	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Promotor constitutivo
		3'nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción)

4.1. *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gram negativas, flageladas, peritricas; forma colonias mucoides y blancas. La composición de bases de DNA varía de 58 a 63.5% GC.

A. tumefaciens es un fitopatógeno que habita de manera natural en el suelo. Cuando *Agrobacterium* es aislada de las raíces de las plantas en ambientes naturales o bajo cultivo, la mayoría de las cepas (más del 90%) no son patogénicas, aun cuando muchos aislamientos son hechos de plantas enfermas. Por lo tanto, *Agrobacterium* es esencialmente un habitante de la rizósfera y únicamente una proporción muy pequeña de cepas son fitopatógenas (contienen el plásmido Ti), las cuales causan la enfermedad conocida como agalla de la corona en un amplio rango de plantas dicotiledóneas especialmente rosáceas como manzana, pera, durazno, cereza, almendra, frambuesa y rosal. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de un tumor al nivel del suelo y aunque reduce el valor comercial de la cosecha, generalmente no causa problemas serios en plantas maduras bien establecidas. La bacteria entra a la planta a través de heridas y transfiere una fracción de su ADN, denominada T-DNA, a las células de las plantas causando la formación de un tumor. El tumor se desarrolla debido a que el T-DNA contiene genes que regulan la biosíntesis de hormonas vegetales como el ácido indolacético y citocininas. Las células infectadas producen unas sustancias denominadas opinas, las cuales son usadas por la bacteria como fuente de energía. El desarrollo de los síntomas en la planta infectada depende de la temperatura, humedad y estado de crecimiento; conforme el tumor incrementa su tamaño la habilidad de la planta para obtener nutrientes disminuye y finalmente detienen su crecimiento con lo cual también empieza la decadencia del tumor liberando las bacterias en el suelo. La bacteria puede permanecer activa en el suelo o en tumores viejos en ausencia de un hospedero adecuado durante un mínimo de dos años y puede dispersarse a través del movimiento de suelo infectado,



implementos agrícolas, escurrimiento de agua o a través de insectos succionadores de savia (López, 1994).

Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rhizobiales
Familia	Rhizobiaceae
Género	<i>Agrobacterium</i>
Especie	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)

4.2. *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea anual de ciclo corto con una altura comprendida entre los 10 y 30 cm, miembro de la familia Brassicaceae, sin valor comercial con presencia en los 5 continentes, utilizada en biología molecular como planta modelo para dicotiledóneas. Planta de tallo erecto con ramificación un poco alejada de la base. Las hojas son simples de elípticas a ovales con los bordes enteros. Tiene dos tipos de hojas, las basales de hasta 2 cm de largo por 0.5 cm de ancho, arrosietadas y las caulinares (las que están a lo largo del tallo), éstas son más pequeñas y sésiles esto es carentes de pecíolo. Las inflorescencias se presentan en racimos, en el extremo de las ramas o el tallo, no demasiados compactos, éstas se van separando unas de otras a medida que el tallo crece, por lo que los pedúnculos de los frutos maduros estarán separados del orden de un centímetro entre ellos. Las flores son hermafroditas de unos 0.5 cm de diámetro, normalmente con cuatro pétalos blancos, espatulados. Se distinguen en ella sin dificultad todos los órganos florales. El fruto es una silicua linear que aparece del centro de la flor, alargado, de unos 3 cm de longitud y 1 mm de ancho, cilíndrico, un poco arqueado y sin pubescencia. Estos contienen dos cavidades en las que se alojan las semillas ovoideas en hilera, sin tocarse entre ellas, en número elevado; unas 30 por silicua. En la madurez tienen un color anaranjado son lisas y miden medio milímetro aproximadamente.

Elegida como especie modelo por su minúsculo tamaño, rapidez de reproducción, gran número de semillas por planta, genoma compacto (125 mega pares de bases) y la facilidad de realizar cruces y transformación genética. Los atributos de *Arabidopsis* que permiten su utilización experimental han permitido que en menos de 15 años sea considerada la especie mejor entendida de todo el reino vegetal. Al analizar el genoma de esta planta, se encontró que se trata de un genoma muy pequeño pero con un gran número de genes y que un 8% concuerda con genes animales, sobre todo los vinculados con el metabolismo primario (síntesis de elementos básicos, como azúcares o lípidos). *Arabidopsis* comparte genes funcionales (germinación, floración, formación de semillas) con otras plantas como el arroz, la soya, el trigo, el maíz y el algodón. En el año 2000 se presentó por vez primera el genoma completo de una planta, el de *Arabidopsis thaliana*, en el que se identificaron 25,498 genes que codifican proteínas para 11,000 familias (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)



Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Dilleniidae
Orden	Capparales
Familia	Brassicaceae/Cruciferae
Género	<i>Arabidopsis</i> Heynh.
Especie	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>)

4.3. *Zea mays*.

El maíz es uno de los granos de mayor cultivo en todo el mundo, motivo por el cual se puede decir que tanto la semilla como cualquier derivado cuenta con un historial de uso seguro en alimentación/uso humana y animal. Los pueblos indígenas del hemisferio occidental han utilizado el grano de maíz desde tiempos ancestrales. El maíz se cultiva comercialmente en más de 100 países, con un total cosechado de más de 590 millones de toneladas métricas. Los principales productores de maíz son Estados Unidos, China, Brasil, México, Francia y Argentina. El maíz se cultiva principalmente por sus granos, los cuales en su mayor parte se someten a un proceso de refinado para obtener productos utilizados en una amplia variedad de artículos alimenticios, médicos e industriales.

El maíz es un producto alimenticio básico en México y el consumo nacional *per capita* es de 187 kg (García, 2012). El 68% de la producción de maíz en México se consume directamente como alimento, en comparación con el promedio global de 21%. Bourges (2002), en un estudio sobre dietas mexicanas reportó que el grano de maíz, consumido en forma de tortillas, constituía un promedio del 59% de la ingesta de fuentes de energía y el 39% de la ingesta de proteínas.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Liliopsida (monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae/Gramineae
Género	<i>Zea</i> L.
Especie	<i>Zea mays</i> L.

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

4.4. *Helianthus annuus*.

El girasol (*Helianthus annuus*) es una planta que tiene un largo historial de uso seguro; tanto la semilla como el aceite son ampliamente consumidos de manera directa o como ingrediente en una gran cantidad de alimentos procesados (USA Sunflower Association: www.girasol-usa.com).

Es una planta herbácea, anual, de gran porte, que puede alcanzar los 2 m de altura. Para su óptimo desarrollo necesita de una gran cantidad de horas de insolación y mucha humedad. Posee hojas de forma triangular, ásperas al tacto. Los frutos, que popularmente se denominan "pipas",



son grandes, de unos 2 cm de largo y de color blanco, gris o negro, según la variedad de que se trate.

La floración se produce en los meses de verano. Esta planta tan peculiar debe su nombre al hecho de que mueve su inflorescencia siguiendo el movimiento solar, de forma que al amanecer la orienta hacia el este y continúa girando a medida que avanza el día, hasta quedar orientada hacia el poniente; así, los rayos solares inciden perpendicularmente sobre ella. Las inflorescencias son muy grandes, lo que en ciertas ocasiones hace que el tallo se incline por su propio peso; a su alrededor se encuentran unas lígulas alargadas de color amarillo. La recolección se efectúa cuando las semillas están maduras (www.oleaginosas.org).

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae/Compositae
Género	<i>Helianthus</i> L.
Especie	<i>Helianthus annuus</i> L. (girasol)

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

4.5. *Oryza sativa*.

El arroz es uno de los cereales más valiosos en México y en el mundo por su alto contenido de energía y proteínas. Tiene una gran variedad de usos para consumo humano en diversos platillos y bebidas, así como para la elaboración de alimento balanceado para ganado.

La planta del arroz tiene un tallo cilíndrico formado de nudos y entrenudos alternados con hojas seguidos de secciones sin ellas. Su altura va desde sesenta hasta 120 cm. Las hojas son largas y planas. En el punto donde la hoja se une al tallo, hay una lígula con una serie de cirros largos y sedosos. Las flores del arroz son de color verde blanquecino dispuestas en espiguillas, que en conjunto se denominan panoja. Una vez que ha floreado, las espigas son estrechas y colgantes. El grano de arroz es el ovario maduro. Cuando se le quita la cáscara pardusca o pericarpio, se dice que se ha pulido. De otra forma, se trata de arroz integral, preferido por muchas personas por su alto contenido de fibra (www.siap.gob.mx).

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Liliopsida (monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae/Gramineae
Género	<i>Oryza</i> L.
Especie	<i>Oryza sativa</i> L. (arroz)



Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

4.6. *Flaveria bidentis*.

Flaveria bidentis es una planta anual con una altura de alrededor de 50 cm; su tallo es generalmente de color púrpura; hojas opuestas, sésiles (sus bases unidas al tallo y a la hoja opuesta), angostas, de hasta 5 cm de largo y hasta 0.6 cm de ancho, a veces con el margen aserrado. Las flores se agrupan en cabezuelas apretadas sobre numerosos ejes cuyo ápice tiende a enroscarse, ubicados hacia la punta de los tallos formando una inflorescencia de aspecto redondeado. Cada inflorescencia está formada por 5 a 11 flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo pequeño que no presenta brácteas (páleas), el conjunto de flores está rodeado por fuera por 5 brácteas (que constituyen el involucre) oblongo-ovadas o con forma de “lancha”. Frecuentemente se presenta otra bráctea diminuta en la base del involucre. Flores liguladas una o bien ausentes, fértil, la corola es un tubo en la base y a manera de cinta hacia el ápice, semejando el pétalo de una flor sencilla, de aproximadamente 3 mm de largo, casi circular, amarilla. Flores del disco 5 a 10, hermafroditas, la corola mide aproximadamente 2 mm de largo y es un tubo que hacia el ápice se ensancha (con forma de embudo) y se divide en 5 lóbulos, de color amarillo. Cáliz ausente. El fruto es un aquenio y no se abre (indehiscente), contiene una sola semilla, es más o menos cilíndrico aunque a veces algo más ancho hacia el ápice, algo comprimido y acostillado, mide aproximadamente 1 mm de largo (cuando se presenta, el fruto de la flor ligulada es ligeramente más largo), sin vilano (www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/).

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae/Compositae
Género	<i>Flaveria</i> Juss.
Especie	<i>Flaveria bidentis</i> (L.) Kuntze

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

4.7. *Petunia hybrida*.

Petunia hybrida es una planta perenne que alcanzan entre 15 y 45 cm de altura; las hojas están dispuestas de forma alterna u opuestas, son ovaladas, alargadas y de bordes enteros, bastante oscuras y pegajosas. Las flores son solitarias y axilares con cáliz tubular y corola en forma de trompeta, miden entre 5 y 13 cm de diámetro. Las petunias son plantas ornamentales muy conocidas. Desarrollan una abundante floración durante un largo periodo; desde la primavera hasta finales de otoño.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)



Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Petunia</i> Juss.
Especie	<i>Petunia hybrida</i> Vilm

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

4.8. Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV).

El virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV) es un Nanovirus con un rango de hospedantes restringido principalmente a especies de la familia Fabaceae como trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), alfalfa (*Medicago sativa*), chícharo (*Pisum sativum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). En la naturaleza este virus es transmitido únicamente por afidos como *Aphis craccivora*, *A. gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae*. No se conocen efectos tóxicos para el hombre del virus de la atrofia subterránea del trébol.

Phylum	-
Clase	-
Orden	-
Familia	Nanoviridae
Género	Nanovirus
Especie	Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV)

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/>).

4.9. Virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

El virus del mosaico de la coliflor (CaMV) es un Caulimovirus con un rango de hospederos restringido principalmente a plantas de la familia *Brassicaceae* (col, coliflor, colza, mostaza); aunque también se ha reportado de manera esporádica en cacahuate, soya y casava. No se conocen efectos tóxicos para el hombre del virus en mosaico de la coliflor. Los Caulimovirus representan uno de los dos grupos de pararetrovirus vegetales que incluye al promotor 35S. El otro grupo, Badnavirus, se encuentra en forma natural en banana, cacao, cítricos, camote, piña y caña de azúcar. Las partículas del CaMV contienen una molécula circular de DNA de doble cadena. En el núcleo de las plantas hospedantes el DNA se presenta como mini-cromosoma cuya transcripción produce moléculas de RNA. Este RNA es el templado para la transcriptasa reversa que produce copias de DNA del CaMV que será empacado en nuevas partículas virales. El RNA se utiliza para la síntesis directa de proteínas virales entre las que se incluye las que integran la cápside.

Phylum	-
Clase	-
Orden	-
Familia	Caulimoviridae
Género	Caulimovirus
Especie	Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/>).



4.10. Virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV).

El virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV) es un Caulimovirus que infecta las plantas de cassava (*Manihot esculenta*) en Brasil. El CsVMV tiene partículas esféricas de 50 a 60 nm de diámetro que se observan como cuerpos de inclusión citoplasmáticos y contienen una molécula circular de DNA de doble cadena (dsDNA). El CsVMV es particularmente importante en la biotecnología vegetal debido a que posee un promotor que dirige una alta expresión de transgenes en diferentes plantas, así como en protoplastos, y ha sido utilizado en el desarrollo de plantas con tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos y enfermedades (Rao, 2015; Verdaguer *et al.*; 1998).

Phylum	-
Clase	-
Orden	-
Familia	Caulimoviridae
Género	Cavemovirus
Especie	virus del mosaico de la nervadura de la yuca (CsVMV)

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/>).

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

Tecnología GlyTol™ TwinLink™ Plus (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102)

Bayer CropScience NV
Innovation Center for Plant Biotechnology
Technologiepark 38
9052 Ghent, Belgium

Bayer CropScience LP
2 T.W. Alexander Drive
P.O. Box 12014
Research Triangle Park
RTP, North Carolina 27709 USA

Semilla (variedades FiberMax™ y Stonville™)

Bayer CropScience
Seeds Innovation Center
103 Erskine Street
Lubbock, TX 79403 USA

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

1. Origen y diversificación del algodón.

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



Nuevo Mundo. Los cromosomas en el genoma **D** son más pequeños que los cromosomas de los otros genomas (Milton and Allen, 1995).

Además de las 45 especies diploides, existen cinco especies alotetraploides ($2n=4x=52$) originarias del Nuevo Mundo, de las cuales cuatro son originarias del continente Americano y una de 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 anfidiplóide⁷ (**AADD**, $2n=4x=52$) produjo híbridos fértiles cuando fue cruzado con especies tetraploides americanas. Dos especies diploides y dos tetraploides de *Gossypium* son las especies cultivadas actualmente (Milton and Allen, 1995):

G. arboreum L., ($2n=2x=26$) genoma **A**, cromosomas largos,
G. herbaceum 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.

En México y Australia se localizan 29 de las especies conocidas, 13 son de México. Estas se encuentran distribuidas en toda la zona costera del Océano Pacífico y en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Veracruz. En 1905 investigadores extranjeros iniciaron expediciones formales para coleccionar la variabilidad genética de *Gossypium* existente en nuestro país. A la fecha se tienen registradas 16 expediciones, siete de ellas a partir de 1975, año en que por primera vez se contó con la participación de investigadores nacionales. México ha participado en seis expediciones en que se cubrieron todas las regiones donde existe algodón nativo, lográndose coleccionar todas las especies y razas de *G. hirsutum*, excepto una, la raza *G.h. latifolium* la que, parece ser extinta. La variabilidad genética coleccionada ha sido muy útil en la mejora genética del cultivo, un ejemplo al respecto es el caso de las variedades tipo Acala, que se caracterizan por su alta calidad de fibra, obtenidas por selección de *G.h. latifolium*. De la especie *G. harknessii* se aisló el sistema de esterilidad genético-citoplásmica que hizo posible la formación de algodones híbridos. Las especies *G. anomalum* y *G. arboreum* aportaron genes de resistencia a la "viruela del algodón" (*Puccinia cacabata* R&B) y otras especies han aportado características que confieren resistencia al daño de las plagas, por ejemplo, la ausencia de nectarios extraflorales y partes vegetativas glabras que confieren resistencia al daño de gusano bellotero (*Helicoverpa zea* B.) y gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* S.) (Fryxell, 1984; Palomo, 1996).

El sureste de México y Guatemala es considerado como el centro de origen y diversidad de la especie *Gossypium hirsutum* L., la cual es la especie cultivada más importante en la actualidad. Adicionalmente, 11 de las 13 especies silvestres diploides conocidas son endémicas de México. Éstas se encuentran distribuidas en la zona costera del Océano Pacífico y en los Estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Veracruz (Fryxell, 1984; Palomo, 1996).

2. Especies silvestres y distribución.

⁷ Anfidiplóide (alopoliploide): poliploide formado tras la unión de dos conjuntos de cromosomas distintos y su posterior duplicación.



De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), se reportan las siguientes especies de *Gossypium* para la región Norte de México (Cuadro 5).

Cuadro 5. Especies de *Gossypium* reportadas en la literatura para el Norte de México.

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

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

G. aridum (Rose y Standley) Skovsted, está distribuida en las costas de Veracruz, Puebla, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Colima y Sinaloa. Posee hojas enteras, lo cual la coloca entre las especies más antiguas. La flor es de color rosáceo con centro de color rojo-oscuro. La cápsula (bellota o fruto) es alargada con cuatro celdas (lóculos) que contienen numerosas semillas de 4 a 6 mm de largo. La fibra que cubre la semilla es muy corta y de color café. Es la única especie diploide de México que se localiza en las costas del Océano Atlántico y cuenta con genes que confieren resistencia a las enfermedades conocidas como viruela del algodón (*Puccinia cacabata* A&H), y secadera tardía (*Verticillium dahliae* K.). Esta especie es caducifolia y florea cuando no presenta hojas, se desarrolla en pendientes y suelos delgados y pedregosos.

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

G. davidsonii Kellogg, se localiza en las costas sur de Sonora y Baja California Sur y en las Islas de Revillagigedo. Esta especie es de interés desde el punto de vista evolutivo del género *Gossypium*, ya que tiene hojas enteras ovadas y es difícil de cruzar con otras especies. La evolución del género es en el sentido de pasar de formas con hojas enteras hacia formas con hojas partidas (lobuladas), por tal razón, es posible que *G. davidsonii* sea la especie más ancestral que surgió en las primeras fases de la evolución de este género (Lemeshev, 1978). La flor es de color amarillo con una pequeña mancha de color rojo en el interior, su cápsula es ovoide y



generalmente, tiene cuatro lóculos. La semilla mide 6 mm de largo y tiene fibra corta y escasa. Esta especie se caracteriza por contar con una alta pubescencia en sus órganos vegetativos, lo que le da resistencia al ataque de plagas (insectos chupadores).

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

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

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

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

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

G. trilobum (Mocino y Sessé) Skovsted, se localiza en Michoacán, Morelos, Puebla y Sinaloa. Posee hojas con tres lóbulos bien definidos en las inflorescencias. La flor es ligeramente amarilla con el centro de color rojo. La cápsula es glabra con tres (raramente dos) lóculos y de forma



oblonga. Cada lóculo contiene de ocho a 10 semillas, cuya longitud es de 3 a 4 mm. Las pubescencias de la semilla son muy pequeñas y ligeramente amarillentas.

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

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

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

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

En adición a las especies diploides endémicas de México mencionadas anteriormente, se reporta la presencia de la especie tetraploide de origen Peruano **G. barbadense**. Esta especie es un arbusto o subarbusto anual que no tiene mucha importancia comercial en México y de acuerdo con información de la CONABIO⁸, se tienen registros para los Estados de Baja California Sur, Sinaloa, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán (www.conabio.gob.mx).

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

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

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

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

⁸ Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.



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

G. hirsutum yucatanense, es originaria de la Costa norte de Yucatán, es una planta rastrera con flor de color amarillo y fibra de color café.

G. hirsutum punctatum, se le encuentra en los Estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo. Tiene bellotas de redondas a ovales y de diferente tamaño. Poseen fibra larga, de color café o blanco. La longitud de la fibra varía de los 24 mm a los 29.2 mm.

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

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a todas las especies de *Gossypium* que no se requiere repetir para cada taxón. Todas las especies de *Gossypium* presentan autopolinización aunque pueden presentarse ciertos cruzamientos intra específicos y posiblemente inter específicos mediados por insectos. El transporte del polen por el viento en el género *Gossypium* nunca se ha reportado lo cual es explicado por la textura y consistencia del polen producido en antesis. El polen de *G. hirsutum* es viable por no más de 24 horas. Cada flor, como las todos los miembros de Malvaceae, son receptivas únicamente el día en que abren.

Las especies silvestres reportadas para México son diploides ($2n=2x=26$) y, por lo tanto, son sexualmente incompatibles con el algodón cultivado *G. hirsutum* el cual es una especie alotetraploide ($2n=4x=52$). En el caso de se pudieran encontrar especies silvestres cercanas a las regiones agrícolas y en el improbable caso de que pudieran quedar en contacto con polen de *G. hirsutum* (tetraploide), el producto de la fecundación sería triploide y durante la metafase de la meiosis no se podría realizar el apareamiento de homólogos, imposibilitando así la formación de un cigoto fértil por la disparidad de los sistemas genéticos (Stewart, 1995; Wendel *et al.*, 2010; Kantartzi, 2010). A esta barrera genética se debe incluir la barrera temporal para el entrecruzamiento ya que no se presenta coincidencia en los períodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales. Por otra parte, la distribución de la especie alotetraploide *G. barbadense* se encuentra limitada principalmente al sureste de México lejos de las zonas productoras de algodón comercial en el norte de la República Mexicana.

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

1. Evento GHB614.

La organización de los elementos genéticos dentro del inserto en el algodón GHB614 fue caracterizada mediante PCR, amplificando tres fragmentos de hibridación del DNA cubriendo la



longitud completa del inserto. Los productos de PCR generados, seguidos del análisis PCR del DNA genómico del algodón GHB614, fueron del tamaño esperado.

La secuencia de DNA de la región flanqueante 5', inserto transgénico, región flanqueante 3' y del *locus* de pre-inserción del evento GHB614 fue determinada por PCR, utilizando DNA genómico aislado de plantas de algodón GHB614 y de la variedad convencional Cocker 312. Para la determinación de las secuencias del sitio de integración, se amplificaron tres fragmentos de hibridación utilizando *primers* específicos y DNA del algodón GHB614 como plantilla.

La secuencia del sitio blanco de integración se determinó utilizando DNA aislado de plantas transgénicas homocigóticas BC₂F₅ y DNA control de algodón convencional. Se utilizó un *primer* específico en dirección 5' y otro en dirección 3' del inserto (T-DNA) para amplificar el sitio blanco de inserción en el algodón convencional. Se obtuvo una secuencia consenso derivada de los tres fragmentos del evento GHB614 y se preparó una secuencia consenso que contenía las secuencias del algodón convencional (*Gossypium hirsutum*) en el sitio de integración.

La secuencia derivada del *locus* transgénico fue comparada con la secuencia del T-DNA del vector pTEM2 para determinar la posición de la secuencia transgénica insertada, los diferentes elementos genéticos presentes en el inserto, así como las secuencias flanqueantes 5' y 3'. Subsecuentemente, la secuencia derivada del *locus* de pre-inserción fue comparada con el *locus* transgénico para determinar el sitio blanco de delección mediante la alineación de ambas secuencias, utilizando el software Clone Manager. Los resultados de este análisis indican que no se observan diferencias entre las secuencias transgénicas insertadas y las secuencias del T-DNA del vector pTEM2. Las secuencias flanqueantes 5' y 3' también son idénticas a las secuencias determinadas en el sitio de integración del algodón convencional antes de la transformación. Finalmente, el arreglo de los elementos genéticos dentro del inserto es idéntico a la configuración diseñada en el vector pTEM2.

La secuencia del *locus* transgénico determinada consistió de 738 bp para la secuencia flanqueante 5', 3978 bp para el inserto transgénico y 214 bp para la secuencia flanqueante 3'. Asimismo, se determinaron 947 bp en el *locus* de pre-inserción (algodón convencional), incluyendo 727 bp de la secuencia flanqueante 5', 203 bp de la secuencia flanqueante 3' y un fragmento de 17 bp presente en el algodón convencional pero no en el *locus* del evento GHB614, lo que indica que este fragmento fue eliminado en el sitio de inserción después de la integración del T-DNA del vector pTEM2 (Figura 3). La secuencia detallada del evento GHB614, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización es **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

Figura 3. Productos de PCR generados a través del inserto en algodón GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



2. Evento T304-40.

La secuencia de DNA del *locus* transgénico incluyendo las secuencias transgénicas insertadas, ambas secuencias flanco (5' y 3') y el *locus* de pre-inserción del evento T304-40 fueron determinadas mediante PCR, utilizando DNA genómico aislado de plantas de algodón T304-40 (BC₁F₃) y de la variedad convencional Cocker 315. Para la determinación de las secuencias del sitio de integración, se amplificaron cinco fragmentos de hibridación utilizando *primers* específicos y DNA del algodón T304-40 como plantilla. Asimismo, para determinar la secuencia del sitio de integración previa a la transformación genética, se amplificó un fragmento usando un *primer* específico en dirección 5' y otro en dirección 3' del inserto, utilizando DNA genómico del algodón convencional Cocker 315 como plantilla. Se obtuvo una secuencia consenso derivada de los cinco fragmentos del evento T304-40 y se preparó una secuencia consenso que contenía las secuencias del algodón convencional (*Gossypium hirsutum*) en el sitio de integración.

La secuencia del *locus* transgénico determinada consistió de 479 bp para la secuencia flanco 5', 9056 bp para el inserto transgénico y 320 bp para la secuencia flanco 3'. La secuencia del inserto transgénico de 9056 bp consiste de una secuencia parcial del terminador 3'me1, seguido de dos copias parciales del *cassette* del gen *cry1Ab* en orientación extremo - extremo (*tail - tail*), un *cassette* con una secuencia parcial del promotor Ps7s7 y otro que contiene una secuencia parcial del terminador 3'me1, así como una copia parcial del *cassette* del gen *bar*, en el cual está presente una secuencia parcial del terminador 3'nos. Uno de los *cassettes* de *cry1Ab* contiene una secuencia parcial del promotor Ps7s7 y un segundo *cassette* *cry1Ab* contiene únicamente una copia parcial del terminador 3'me1. El arreglo del inserto correspondiente al T-DNA del vector pTDL008 en el algodón T304-40 se presenta en la [Figura 4](#). El alineamiento de la secuencia del evento T304-40 con la secuencia del T-DNA del vector pTDL008 reveló la sustitución de una base en el terminador adicional 3'me1. La citidina en la posición 8979 de la secuencia del vector pTDL008 fue sustituida por adenosina en la posición 670 del *locus* transgénico T304-40.

Como resultado del evento de transformación se crearon cuatro nuevas uniones, dos localizadas en los extremos 5' y 3' del inserto y dos localizadas dentro del inserto debido a un re-arreglo ([Figura 5](#)).

La secuencia del *locus* de pre-inserción determinada consistió de 837 bp, lo cual incluye 480 bp para la secuencia flanco 5', 325 bp para la secuencia flanco 3' y un sitio blanco de delección de 32 bp que fue eliminado durante el proceso de transformación y, por lo tanto, no se encuentra en el *locus* transgénico. Estas secuencias flanqueantes 5' y 3' son idénticas a las determinadas en el algodón convencional Cocker 315, lo cual demuestra que el origen de las secuencias flanco 5' y 3' del evento T304-40 es la planta de algodón *Gossypium hirsutum*. Asimismo, todas las secuencias transgénicas insertadas se derivan del plásmido pTDL008. La secuencia detallada del evento T304-40, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización son **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

[Figura 4](#). Esquema del *locus* correspondiente al evento T304-40 y del *locus* de pre-inserción.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Figura 5](#). Localización de las regiones de unión del DNA insertado en el algodón T304-40.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



3. Evento GHB119.

La secuencia de DNA del *locus* transgénico incluyendo las secuencias transgénicas insertadas, ambas secuencias flanco (5' y 3') y el *locus* de pre-inserción del evento GHB119 fue determinada mediante PCR, utilizando DNA genómico aislado de plantas de algodón GHB119 (T₀) y de la variedad convencional Cocker 312. Para la determinación de las secuencias del sitio de integración, se amplificaron tres fragmentos de hibridación utilizando *primers* específicos y DNA del algodón GHB119 como plantilla. Asimismo, para determinar la secuencia del sitio de integración previa a la transformación genética, se amplificó un fragmento utilizando un *primer* específico en dirección 5' y otro en dirección 3' a partir de la secuencia transgénica insertada, utilizando DNA genómico del algodón convencional Cocker 312 como plantilla. Se obtuvo una secuencia consenso derivada de los tres fragmentos del evento GHB119 y se preparó una secuencia consenso que contenía las secuencias del algodón convencional (*Gossypium hirsutum*) en el sitio de integración.

La secuencia derivada del *locus* transgénico fue comparada con la secuencia del T-DNA del vector pTEM12 utilizando el software Clone Manager, para determinar la posición e integridad de la secuencia transgénica insertada, los diferentes elementos genéticos presentes en el inserto, así como las secuencias flanco 5' y 3' y el sitio blanco de delección, comparando las secuencias derivadas del *locus* de pre-inserción con las secuencias del *locus* transgénico.

La secuencia del *locus* transgénico determinada consiste de 358 bp de la secuencia flanco 5', 4302 bp de la secuencia transgénica integrada y 320 bp de la secuencia flanco 3' ([Figura 6](#)). La secuencia insertada es totalmente idéntica a la secuencia y configuración del T-DNA del vector pTEM12. Asimismo, se determinó la secuencia del *locus* de pre-inserción que contiene 684 bp, incluyendo 367 bp de la secuencia flanco 5', 309 bp de la secuencia flanco 3' y 8 bp del sitio blanco de delección que fue eliminado durante el proceso de transformación y, por lo tanto, no se encuentra en el *locus* transgénico. Las secuencias flanco 5' y 3' determinadas en el *locus* transgénico son idénticas a las secuencias 5' y 3' determinadas en el *locus* de algodón convencional, lo que demuestra que las secuencias flanco del algodón GHB119 corresponden exactamente al genoma de *Gossypium hirsutum*. La secuencia detallada del evento GHB119, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización son **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

[Figura 6](#). Esquema del *locus* transgénico en el algodón GHB119 comparado con el T-DNA del vector pTEM12 y el sitio de pre-inserción en el algodón convencional Coker 312.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

4. Evento COT102.

El inserto de DNA en el algodón COT102 y las regiones flanco fueron secuenciadas usando una combinación de las herramientas Universal Genome Walker y amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La alineación de la secuencia transgénica del evento COT102 con la secuencia del vector pCOT1 resultó en una alineación exacta para todos los elementos genéticos funcionales contenidos dentro del T-DNA. Durante el proceso de transformación del algodón Coker 312 para producir el evento



COT102, se truncaron algunas secuencias de los bordes. En la secuencia del borde izquierdo fueron truncados 19-25 bp y en el borde derecho de 25 – 24 bp. Estas deleciones no tienen ningún impacto en la expresión de las proteínas APH4 o Vip3Aa19 (VIP3A), este fenómeno ha sido observado previamente en transformaciones genéticas mediadas por *Agrobacterium* y ha sido reportado en la literatura científica (Tinland and Hohm, 1995).

El evento COT102 (SYN-IR102-7) es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento COT102 sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

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

Los fragmentos de DNA insertados en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 corresponden a los que contienen sus eventos parentales individuales. Por lo tanto, las características de las inserciones y secuencias flanco 5' y 3' están conservados en este evento apilado. Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas de los eventos individuales comprendidos en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se describen en el inciso anterior (I.h.).

1. Secuencias flanqueantes.

1.1. Evento GHB614.

La secuencia de DNA de la región flanqueante 5', inserto transgénico, región flanqueante 3' y del *locus* de pre-inserción del evento GHB614 fue determinada por PCR, utilizando DNA genómico aislado de plantas de algodón GHB614 y de la variedad convencional Cocker 312. Para la determinación de las secuencias del sitio de integración, se amplificaron tres fragmentos de traslape utilizando *primers* específicos y DNA del algodón GHB614 como plantilla. Asimismo, para determinar la secuencia del sitio de integración previa a la transformación genética, se amplificó un fragmento utilizando un *primer* en dirección 5' y otro en dirección 3', a partir de la secuencia transgénica insertada. Se obtuvo una secuencia consenso derivada de los tres fragmentos del evento GHB614 y se preparó una secuencia consenso que contenía las secuencias del algodón convencional (*Gossypium hirsutum*) en el sitio de integración.

La secuencia derivada del *locus* transgénico fue comparada con la secuencia del T-DNA del vector pTEM2 para determinar la posición de la secuencia transgénica insertada, los diferentes elementos genéticos presentes en el inserto, así como las secuencias flanqueantes 5' y 3'. Subsecuentemente, la secuencia derivada del *locus* de pre-inserción fue comparada con el *locus* transgénico para determinar el sitio blanco de deleción mediante la alineación de ambas secuencias, utilizando el Clone Manager Software. Los resultados de este análisis indican que no se observan diferencias entre las secuencias transgénicas insertadas y las secuencias del T-DNA del vector pTEM2. Las secuencias flanqueantes 5' y 3' también son idénticas a las secuencias determinadas en el algodón convencional. La secuencia del *locus* transgénico determinada consistió de 738 bp para la secuencia flanqueante 5', 3978 bp para el inserto transgénico y 214 bp para la secuencia flanqueante 3'. Asimismo, se determinaron 947 bp en el *locus* de pre-inserción, incluyendo 727 bp de la secuencia flanqueante 5', 203 bp de la secuencia flanqueante 3' y 17 bp



del sitio blanco de delección. La secuencia detallada del evento GHB614, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización son **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

1.2. Evento T304-40.

La secuencia de DNA del *locus* transgénico incluyendo las secuencias transgénicas insertadas, ambas secuencias flanqueantes y el *locus* de pre-inserción del evento T304-40 fue determinada por PCR, utilizando DNA genómico aislado de plantas de algodón T304-40 (T₀) y de la variedad convencional Cocker 315. Para la determinación de las secuencias del sitio de integración, se amplificaron cinco fragmentos utilizando *primers* específicos y DNA del algodón T304-40 como plantilla. Asimismo, para determinar la secuencia del sitio de integración previa a la transformación genética, se amplificó un fragmento utilizando un *primer* en dirección 5' y otro en dirección 3', a partir de la secuencia transgénica insertada, utilizando DNA genómico del algodón convencional Cocker 315 como plantilla. Se obtuvo una secuencia consenso derivada de los cinco fragmentos del evento T304-40 y se preparó una secuencia consenso que contenía las secuencias del algodón convencional (*Gossypium hirsutum*) en el sitio de integración.

La secuencia del *locus* transgénico determinada consistió de 479 bp para la secuencia flanqueante 5', 9056 bp para el inserto transgénico y 320 bp para la secuencia flanqueante 3'. La secuencia del inserto transgénico de 9056 bp consiste de una secuencia parcial del terminador 3'me1, seguido de dos copias parciales del *cassette* del gen *cry1Ab* en orientación extremo a extremo, un *cassette* con una secuencia parcial del promotor Ps7s7 y otro que contiene una secuencia parcial del terminador 3'me1, así como una copia parcial del *cassette* del gen *bar*, en el cual está presente una secuencia parcial del terminador 3'nos. Uno de los *cassettes* de *cry1Ab* contiene una secuencia parcial del promotor Ps7s7 y un segundo *cassette* *cry1Ab* contiene únicamente una copia parcial del terminador 3'me1. El alineamiento de la secuencia del evento T304-40 con la secuencia del T-DNA del vector pTDL008 reveló la sustitución de una base en el terminador adicional 3'me1. La citidina en la posición 8979 de la secuencia del vector pTDL008 fue sustituida por adenosina en la posición 670 del *locus* transgénico T304-40.

La secuencia del *locus* de pre-inserción determinada consistió de 837 bp, lo cual incluye 480 bp para la secuencia flanqueante 5', 325 bp para la secuencia flanqueante 3' y un sitio blanco de delección de 32 bp. Estas secuencias flanqueantes 5' y 3' son idénticas a las determinadas en el algodón convencional Cocker 315, lo cual demuestra que el origen de las secuencias flanqueantes 5' y 3' del evento T304-40 es la planta de algodón *Gossypium hirsutum*. Asimismo, todas las secuencias transgénicas insertadas se derivan del plásmido pTDL008. La secuencia detallada del evento T304-40, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización es **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

1.3. Evento GHB119.

La secuencia de DNA del *locus* transgénico incluyendo las secuencias transgénicas insertadas, ambas secuencias flanqueantes y el *locus* de pre-inserción del evento GHB119 fue determinada por PCR, utilizando DNA genómico aislado de plantas de algodón GHB119 y de la variedad convencional Cocker 312. Para la determinación de las secuencias del sitio de integración, se amplificaron tres fragmentos de traslape utilizando *primers* específicos y DNA del algodón GHB119 como plantilla. Asimismo, para determinar la secuencia del sitio de integración previa a la transformación genética, se amplificó un fragmento utilizando un *primer* en dirección 5' y otro en dirección 3', a partir de la secuencia transgénica insertada, utilizando DNA genómico del algodón



convencional Cocker 312 como plantilla. Se obtuvo una secuencia consenso derivada de los tres fragmentos del evento GHB119 y se preparó una secuencia consenso que contenía las secuencias del algodón convencional (*Gossypium hirsutum*) en el sitio de integración.

La secuencia derivada del *locus* transgénico fue comparada con la secuencia del T-DNA del vector pTEM12 para determinar la posición e integridad de la secuencia transgénica insertada, los diferentes elementos genéticos presentes en el inserto, así como las secuencias flanqueantes 5' y 3' y el sitio blanco de delección, comparando las secuencias derivadas del *locus* de pre-inserción con las secuencias del *locus* transgénico.

La secuencia del *locus* transgénico determinada consiste de 358 bp de la secuencia flanco 5', 4302 bp de la secuencia transgénica integrada y 320 bp de la secuencia flanco 3'. La secuencia insertada es totalmente idéntica a la secuencia del T-DNA del vector pTEM12. Asimismo, se determinó la secuencia del *locus* de pre-inserción que contiene 684 bp, incluyendo 367 bp de la secuencia flanco 5', 309 bp de la secuencia flanco 3' y 8 bp del sitio blanco de delección. Las secuencias flanqueantes 5' y 3' determinadas en el *locus* transgénico son totalmente idénticas a las secuencias 5' y 3' determinadas en el *locus* de algodón convencional, lo que demuestra que las secuencias flanco del algodón GHB119 corresponden exactamente al genoma de *Gossypium hirsutum*. La secuencia detallada del evento GHB119, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización son **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

1.4. Evento COT102.

El evento COT102 se obtuvo mediante transformación de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el plásmido pCOT1 (Tinland and Hohn, 1995; Trolinder *et al.*, 1988a, Trolinder *et al.*, 1988b). Este plásmido contiene el gen *vip3Aa19* que confiere resistencia a insectos lepidópteros, así como el gen *aph4* que funciona como marcador de selección.

El número de copias del T-DNA del plásmido pCOT1 insertadas en el genoma del algodón, la integridad de las secuencias codificantes *vip3Aa19* y *aph4*, la integridad de los *cassettes* de expresión de *vip3Aa19* y *aph4*, así como la confirmación de la ausencia del esqueleto del plásmido en el algodón fueron determinados mediante análisis *Southern Blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (*vip3Aa*, *aph4*, promotor actin-2, promotor ubiquitin-3, gen *Spec*, gen RepA, VS1 ori, ColE1 ori) como sondas. Los resultados del análisis indican que el evento COT102 contiene únicamente una copia intacta del T-DNA del plásmido pCOT101, asimismo los resultados confirman la ausencia de cualquier otra secuencia de DNA fuera de los bordes del T-DNA del vector pCOT1 (Artim *et al.*, 2003⁹).

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutricional y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

⁹ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.



2. Número de copias.

2.1. Evento GHB614.

El evento parental GHB614 se obtuvo mediante transformación de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el vector pTEM2. Este vector contiene una construcción quimérica única del gen, diseñada para ser funcional en plantas y conferir tolerancia al herbicida glifosato: Ph4a748A -intron1h3At-TPotpC::2mepsps::3'histon4At. La secuencia del gen *2mepsps* se deriva del gen *epsps* del maíz (*Zea mays*) modificado mediante mutagénesis dirigida en dos nucleótidos. Asimismo, se adicionó un codón de metionina en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína 2mEPSPS para restaurar el sitio de escisión del péptido de tránsito optimizado. El gen *2mepsps* produce una proteína de 47 kDa con función enzimática normal y reducida afinidad con el glifosato.

El DNA genómico aislado del algodón GHB614 fue sometido a análisis *Southern blot* para determinar el número de insertos, número de copias, integridad del *cassette* de expresión de *2mepsps* y la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido. Para este análisis se utilizaron los diferentes componentes del *cassette* de transformación (promotor Ph4a748At-intron1h3At+TPotpC::2mepsps::terminador histon4At), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas (Cuadro 6). El algodón convencional Cocker 312 (usado en la transformación) fue utilizado como control negativo para el análisis. Varias alícuotas de DNA genómico del algodón GHB614 fueron digeridas con las enzimas de restricción *EcoRV*, *BglII*, *PvuII*, *Asel*, *NcoI*, *HindIII*, *AflIII*, *BamHI* y *KpnI* para localizar sitios de restricción en el plásmido pTEM2 (Cuadro 7,

Figura 7).

Para determinar el inserto y número de copias, el DNA fue separado mediante electroforesis y los fragmentos obtenidos fueron transferidos a dos membranas de *nylon* e hibridados con cuatro sondas marcadas con P^{32} que contenían cada elemento genético presente en el vector pTEM2. También se utilizó una quinta sonda marcada con P^{32} para cubrir la longitud total del T-DNA. Los carriles en el gel de agarosa contenían aproximadamente 10 μ g DNA digerido con las enzimas de restricción. La cantidad digerida del vector pTEM2 en los carriles de control positivo es equivalente a una copia del plásmido integrado en 10 μ g de DNA del algodón. Las membranas de hibridación fueron visualizadas por autorradiografía (Sambrook *et al.*, 1989). El número de fragmentos hibridados detectados indica el número de insertos presentes en el algodón GHB614.

Cuadro 6. Sondas utilizadas en el análisis de hibridación *Southern Blot* del algodón GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 7. Esquema del T-DNA del evento GHB614 mostrando la estrategia de hibridación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Los resultados del análisis de hibridación *Southern blot* obtenidos del DNA genómico del algodón GHB614 y Cocker 312 (control negativo), muestran la presencia de un fragmento de integración 5' y un fragmento de integración 3'; asimismo el patrón y tamaño de los fragmentos observados en el análisis de hibridación, comparados con los fragmentos esperados de la digestión de DNA, permiten concluir que se integró únicamente una copia del T-DNA del vector pTEM2 en el algodón GHB614 **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL** (Figuras 4 - 8).

Cuadro 7. Fragmentos de hibridación esperados y observados para el análisis *Southern blot* del algodón GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 8. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda Ph4a748At.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 9. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda intron1 h3At+TPotp C.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 10. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda 2mepsps.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 11. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda 3'histonAt.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 12. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda del T-DNA completo.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL





2.2. Evento T304-40.

El evento parental T304-40 se obtuvo mediante transformación de la variedad de algodón Coker 315 con *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el plásmido pTDL008. Este plásmido contiene una construcción genética que incluye el gen *cry1Ab* que confiere resistencia a insectos lepidópteros, así como una construcción genética que incluye el gen *bar* que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El DNA genómico aislado del algodón T304-40 y de la variedad convencional FiberMax® 966 fue sometido a análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (promotor 5'e1-Ps7s7ter, gen *cry1Ab*, terminador 3'me1, promotor P35S3, gen *bar*, terminador 3'nos), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas (Cuadro 8). El DNA aislado del evento T304-40 generación BC₁F₃ fue digerido con las siguientes enzimas de restricción: *Apal*, *DraIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *NdeI*, *BglI*, *Swal*, *SspI*, *SacI* y *XbaI*. El algodón convencional fue digerido con la enzima *XbaI* y fue usado como control negativo; DNA del algodón convencional digerido con *XbaI* y suplementado con una cantidad equimolar de DNA del plásmido pTDL008 digerido con *XbaI*, fue usado como control positivo.

Para determinar el inserto y número de copias, los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con siete sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética o el T-DNA completo. La estrategia de hibridación utilizada se presenta en la Figura 13.

Cuadro 8. Sondas utilizadas en el análisis de hibridación *Southern blot* del algodón T304-40.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 13. Dibujo esquemático del T-DNA del evento T304-40 mostrando la estrategia de hibridación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Los resultados del análisis de hibridación *Southern blot* obtenidos del DNA genómico del algodón T304-40 y FM966 (control negativo), muestran que únicamente una copia casi completa del T-DNA, flanqueada por una copia incompleta invertida del *cassette* del gen *cry1Ab* y un terminador 3'me1 adicional, fueron transferidos al algodón T304-40 **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL** (Figuras 5 - 7).

Figura 14. Esquema del inserto en el algodón T304-40.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Figura 15. Resultados del análisis de hibridación *Southern blot* con diferentes sondas para el evento T304-40.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 16. Resultados del análisis de hibridación *Southern blot* con diferentes sondas para el evento T304-40 (continuación).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2.3. Evento GHB119.

El evento GHB119 se obtuvo mediante transformación de la variedad de algodón Coker 312 con *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el plásmido pTEM12. Este plásmido contiene una construcción genética que incluye el gen *cry2Ae* que confiere resistencia a insectos lepidópteros, así como una construcción genética que incluye el gen *bar* que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El DNA genómico aislado del algodón GHB119 y de la variedad convencional FM 966 fue sometido a análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (terminador 3'nos, gen *bar*, promotor PCsVMV, promotor P35S2-5'cab22L, gen más péptido de tránsito TPssuAt-*cry2Ae*, terminador más borde derecho 3'35S-RB), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas (Cuadro 9). El DNA aislado del algodón GHB119 generación T₂ fue digerido con una las siguientes enzimas de restricción o combinación de enzimas: *DraI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NcoI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *AvaI*, *NdeI*, *XhoI*, *EcoRI/PstI* y *EcoRI/NdeI*. DNA del algodón convencional (FM 966) digerido con la enzima *EcoRV* y fue usado como control negativo; DNA del algodón convencional (FM 966) suplementado con una cantidad equimolar de DNA del plásmido pTEM12 fue usado como control positivo.

Para determinar el inserto y número de copias, los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con siete sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética, o el T-DNA completo. La estrategia de hibridación se presenta en la Figura 17. La longitud de todos los fragmentos de hibridación fue determinada con el software Genetools disponible comercialmente.

Cuadro 9. Sondas utilizadas en el análisis de hibridación *Southern blot* del algodón GHB119.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Figura 17. Esquema del T-DNA del evento GHB119 mostrando la estrategia de hibridación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Los resultados del análisis de hibridación *Southern blot* obtenidos del DNA genómico del algodón GHB119 y FM 966 (control negativo), muestran la presencia de un fragmento de integración 5' y un fragmento de integración 3'; asimismo el patrón y tamaño de los fragmentos observados en el análisis de hibridación, comparados con los fragmentos esperados de la digestión de DNA, permiten concluir que se integró únicamente una copia del T-DNA del vector pTEM12 en el algodón GHB614 y que el DNA transferido al algodón corresponde a la misma configuración diseñada en el vector de transformación **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL** (Figura 18 - 19).

Figura 18. Resultados del análisis de hibridación *Southern blot* con diferentes sondas para el evento GHB119.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 19. Resultados del análisis de hibridación *Southern blot* con diferentes sondas para el evento GHB119 (continuación).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

1.4. Evento COT102.

El evento COT102 se obtuvo mediante transformación de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el plásmido pCOT1 (Tinland and Hohn, 1995; Trolinder *et al.*, 1988a, Trolinder *et al.*, 1988b). Este plásmido contiene el gen *vip3Aa19* que confiere resistencia a insectos lepidópteros, así como el gen *aph4* que funciona como marcador de selección.

El número de copias del T-DNA del plásmido pCOT1 insertadas en el genoma del algodón, la integridad de las secuencias codificantes *vip3Aa19* y *aph4*, la integridad de los *cassettes* de expresión de *vip3Aa19* y *aph4*, así como la confirmación de la ausencia del esqueleto del plásmido en el algodón fueron determinados mediante análisis *Southern Blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (*vip3Aa*, *aph4*, promotor actin-2, promotor ubiquitin-3, gen *Spec*, gen RepA, VS1 ori, ColE1 ori) como sondas. Los resultados del análisis indican que el evento COT102 contiene únicamente una copia intacta del T-DNA del plásmido pCOT101, asimismo los resultados confirman la ausencia de cualquier otra secuencia de DNA fuera de los bordes del T-DNA del vector pCOT1 (Artim *et al.*, 2003¹⁰).

¹⁰ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.



El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

3. Expresión.

La medición de la expresión génica se puede determinar mediante la cuantificación directa del producto del gen, que en general es una proteína. Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 fueron determinados mediante la técnica de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) y analizados estadísticamente en raíz, hoja, cuadros, bellotas, polen y semilla de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V6, inicio de cuadros, floración y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos (Georgia, Arkansas y Texas), durante el ciclo 2013 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**). Los resultados de la determinación del nivel de expresión de las proteínas se presentan en los Cuadros 10 - 15.

Cuadro 10. Niveles de expresión de la proteína **Cry1Ab** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Cry1Ab (µg/g peso seco)		Cry1Ab (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	12.70 ± 4.02	5.68 - 18.39	2.93 ± 0.79	1.77 - 3.87
	Raíz	9.05 ± 2.26	5.10 - 11.74	1.94 ± 0.38	1.46 - 2.49
Inicio de cuadros	Hoja	16.37 ± 6.05	6.67 - 26.26	3.41 ± 1.38	1.42 - 5.74
Floración	Polen	NA	NA	0.13 ± 0.09	0.04 - 0.29
2 semanas después de primera flor	Hoja	6.12 ± 1.80	3.62 - 10.29	1.72 ± 0.57	0.97 - 3.15
	Cuadros	7.66 ± 1.51	5.30 - 10.49	1.69 ± 0.26	1.34 - 2.25
	Bellotas	5.64 ± 1.44	2.95 - 7.65	0.95 ± 0.24	0.56 - 1.27
	Planta completa	5.30 ± 3.32	0.71 - 10.55	1.51 ± 0.93	0.19 - 3.10
Madurez	Semilla	3.94 ± 0.74	2.98 - 5.32	3.41 ± 0.59	2.56 - 4.33

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 11. Niveles de expresión de la proteína **Cry2Ae** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Cry2Ae (µg/g peso seco)		Cry2Ae (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	152.34 ± 45.64	96.54 – 252.90	35.76 ± 10.53	21.95 - 52.34
	Raíz	12.26 ± 3.64	7.25 - 17.21	2.74 ± 1.09	1.55 - 4.28
Inicio de cuadros	Hoja	165.61 ± 56.59	94.01 - 233.28	33.88 ± 10.98	20.25 - 49.55
Floración	Polen	NA	NA	0.13 ± 0.06	0.05 - 0.29
2 semanas después de primera flor	Hoja	101.42 ± 16.45	78.61 - 133.41	28.39 ± 5.24	20.60 - 37.63
	Cuadros	29.99 ± 10.73	19.56 - 55.03	6.86 ± 3.07	4.05 - 14.17
	Bellotas	17.98 ± 4.92	11.11 - 30.29	3.06 ± 0.94	1.72 - 5.46
	Planta completa	77.82 ± 24.79	55.43 - 137.79	22.27 ± 7.12	13.72 - 39.42
Madurez	Semilla	21.38 ± 2.37	18.14 - 25.34	18.55 ± 2.17	15.56 - 21.81

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.

Cuadro 12. Niveles de expresión de la proteína **Vip3Aa19** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Vip3Aa19 (µg/g peso seco)		Vip3Aa19 (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	167.54 ± 72.47	77.74 - 271.57	37.11 ± 11.63	25.59 - 57.62
	Raíz	74.53 ± 22.90	30.56 - 101.67	15.70 ± 3.52	8.46 - 20.79
Inicio de cuadros	Hoja	312.49 ± 69.47	211.68 - 416.78	64.26 ± 14.03	45.93 - 87.31
Floración	Polen	NA	NA	0.42 ± 0.09	0.29 - 0.57
2 semanas después de primera flor	Hoja	91.66 ± 20.32	60.65 - 118.37	25.69 ± 6.16	15.26 - 31.93
	Cuadros	71.83 ± 16.58	38.16 - 90.87	15.82 ± 2.87	9.83 - 19.47
	Bellotas	62.62 ± 15.91	44.42 - 91.51	10.63 ± 2.91	7.08 - 15.53
	Planta completa	63.59 ± 26.43	29.57 - 116.24	17.78 ± 6.70	9.82 - 34.10
Madurez	Semilla	6.69 ± 1.25	5.02 - 8.86	5.79 ± 1.01	4.34 - 7.45

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 13. Niveles de expresión de la proteína **2mEPSPS** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	2mEPSPS (µg/g peso seco)		2mEPSPS (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	337.59 ± 68.93	251.53 - 447.39	80.89 ± 22.74	48.50 - 110.11
	Raíz	82.86 ± 14.95	49.70 - 103.18	17.75 ± 1.76	14.18 - 20.81
Inicio de cuadros	Hoja	1519.53 ± 478.40	659.30 - 2068.93	315.86 ± 111.11	140.20 - 453.21
Floración	Polen	NA	NA	5.96 ± 3.63	1.38 - 12.70
2 semanas después de primera flor	Hoja	452.3 ± 125.62	340.80 - 785.88	125.57 ± 31.80	96.66 - 206.19
	Cuadros	313.13 ± 60.14	242.45 - 418.57	69.30 ± 10.07	57.08 - 89.69
	Bellotas	127.73 ± 17.10	101.49 - 156.75	21.51 ± 2.56	18.01 - 25.76
	Planta completa	240.63 ± 99.08	122.26 - 425.44	68.31 ± 27.98	40.57 - 121.70
Madurez	Semilla	123.25 ± 9.53	105.44 - 133.25	106.78 ± 7.94	95.09 - 119.67

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.

Cuadro 14. Niveles de expresión de la proteína **PAT/bar** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	PAT/bar (µg/g peso seco)		PAT/bar (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	557.04 ± 60.87	435.82 - 650.48	141.21 ± 63.01	84.57 - 281.95
	Raíz	273.54 ± 71.48	183.73 - 382.20	58.34 ± 9.74	43.79 - 72.38
Inicio de cuadros	Hoja	1425.41 ± 495.75	836.31 - 2210.67	288.57 ± 84.15	182.56 - 435.60
Floración	Polen	NA	NA	0.70 ± 0.52	0.17 - 1.66
2 semanas después de primera flor	Hoja	900.52 ± 284.91	527.54 - 1373.43	250.66 ± 78.49	145.75 - 360.34
	Cuadros	1141.01 ± 319.25	738.50 - 1544.70	250.59 ± 56.35	176.79 - 324.06
	Bellotas	423.67 ± 77.84	324.57 - 547.88	71.32 ± 12.06	52.83 - 87.82
	Planta completa	475.65 ± 112.84	280.49 - 653.81	134.86 ± 28.10	93.09 - 191.80
Madurez	Semilla	259.44 ± 27.46	204.28 - 294.51	224.65 ± 22.11	184.20 - 252.71

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 15. Niveles de expresión de la proteína **APH4** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	APH4 (µg/g peso seco)		APH4 (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	ND	<LLOQ	ND	<LLOQ
	Raíz	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
Inicio de cuadros	Hoja	0.65 ± 0.12 ^a	<LOQ – 0.80	0.12 ± 0.02 ^a	<LOD – 0.15
Floración	Polen	NA	NA	ND	<LOD - <LLOQ
2 semanas después de primera flor	Hoja	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Cuadros	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Bellotas	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Planta completa	ND	<LOD	ND	<LOD
Madurez	Semilla	ND	<LOD ^b	ND	<LOD ^b

Muestras con cantidades no cuantificables de la proteína APH4 estuvieron por debajo del límite de detección (<LOD) o por debajo del límite menor de cuantificación (LLOQ) y no fueron determinadas (ND). NA = No Aplicable.

^a La media y desviación estándar (SD) para peso seco y peso fresco se basan en un total de 6 repeticiones para dos ensayos, el resto de los sitios no fueron cuantificables (<LLOQ o <LOD).

^b El rango para peso seco y peso fresco se basa en un total de 11 repeticiones de tres ensayos.

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

1. Mapas de las construcciones genéticas.

1.1. Evento GHB614.

Para introducir el gen de interés en las plantas de algodón se utilizó el vector pTEM2. Este vector contiene una construcción quimérica única del gen *2mepsps*, diseñada para ser funcional en plantas de algodón y conferir tolerancia al herbicida glifosato: Ph4a748A-intron1h3At-TPotpC::*2mepsps*::3'histon4At (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

El vector **pTEM2** es un derivado de pGSC1700 (Cornelissen and Vandewiele, 1989), que fue construido en *Escherichia coli* y posteriormente transferido a una cepa adecuada de *Agrobacterium tumefaciens*.

El vector **pTEM2** comprende los siguientes elementos estructurales (Figura 20 - 21):

- El núcleo del plásmido, que incluye el origen de replicación del plásmido pBR322 (Bolívar *et al.*, 1977) para replicación en *Escherichia coli* (ORI Co1E1), y un fragmento de restricción que incluye el origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.*, 1984) para replicación en *Agrobacterium tumefaciens* (ORI pVS1).
- Un gen marcador de selección (*aadA*) que confiere resistencia a estreptomycin y espectinomycin, para selección del plásmido en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*



tumefaciens (Leemans *et al.*, 1982).

- Una región consistente en un fragmento de neomycin fosfotransferasa que codifica la secuencia del gen *nptII* del transposón Tn903 (Oka *et al.*, 1981).

Estas secuencias son funcionales únicamente en el huésped bacteriano y se ubican fuera de los bordes del T-DNA, por lo tanto, no fueron transferidas al genoma del algodón.

El vector también contiene una región artificial de T-DNA, que consiste en las secuencias de los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988) y sitios de clonación multi-enlace que permiten la inserción de genes quiméricos entre los bordes del T-DNA. No hay secuencias residuales del T-DNA de *A. tumefaciens* entre los bordes del vector pTEM2.

Los elementos genéticos presentes en la región del T-DNA del vector pTEM2 se describen en el Cuadro 16.

Figura 20. Mapa del vector pTEM2.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 21. Diagrama del T-DNA del plásmido pTDL008.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Cuadro 16. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTEM2.

Elemento genético	Tamaño (pares de bases)	Función/ Referencia
LB	24	Borde izquierdo del T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988)
Ph4a748At	1010	Promotor del gen <i>H4</i> de la histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté <i>et al.</i> , 1987) que controla la expresión del gen <i>2mepsps</i> . El promotor Ph4a748, combinado con el <i>intron</i> del gen II de la histona variante H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet <i>et al.</i> , 1992) dirige una alto nivel de expresión constitutiva, especialmente en tejidos vegetales en rápido crecimiento.
intron1 h3At	516	<i>Intron</i> del gen II de la histona variante H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet <i>et al.</i> , 1992).



Elemento genético	Tamaño (pares de bases)	Función/ Referencia
TPotp C	372	Péptido de tránsito optimizado que dirige la translocación de la proteína madura a los cloroplastos, sitio donde la proteína 2mEPSPS es funcionalmente activa (Lebrun <i>et al.</i> , 1996) Este péptido de tránsito se deriva de secuencias obtenidas de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo) de maíz y girasol, una enzima presente en todas las plantas fotosintéticas (Lebrun <i>et al.</i> , 1996).
2mepsps:	1337	Secuencia codificante del gen con mutación doble 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa derivado de <i>Zea mays</i> (Lebrun <i>et al.</i> , 2003)
3'histonAt	742	Señal de poliadenilación de la región 3' no traducida del gen de la histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté <i>et al.</i> , 1987)
RB	24	Borde derecho del T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988)

1.2. Evento T304-40.

Para la obtención del evento T304-40 se utilizó el vector **pTDL008**. Este vector contiene una construcción genética diseñada para ser funcional en plantas de algodón y conferir resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio: promotor 5'e1-Ps7s7ter-gen *cry1Ab*-terminador 3'me1-promotor P35S3-gen *bar*-terminador 3'nos (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

La estructura del vector contiene los siguientes elementos genéticos ([Figura 22 - 23](#)):

- El núcleo del plásmido que contiene el origen de replicación del plásmido pBR322 (Bolívar *et al.*, 1977) para la replicación en *Escherichia coli* (ORI Co1E1) y un fragmento de restricción que contiene el origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.*, 1984) para la replicación en *Agrobacterium tumefaciens* (ORI pVS1).
- Un gen marcador de selección (*aadA*) que confiere resistencia a estreptomycin y espectinomycin para la propagación y selección del plásmido en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.
- Una región de DNA que consiste en un fragmento de neomicin fosfotransferasa que codifica la secuencia del gen *nptI* del transposón Tn903 (Oka *et al.*, 1981).

Estas secuencias son funcionales únicamente en el huésped bacteriano y se ubican fuera de los bordes del T-DNA, por lo tanto, no fueron transferidas al genoma del algodón.

El vector también contiene una región artificial de T-DNA, que consiste en las secuencias de los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988) y sitios de clonación multi-enlace que permiten la inserción de genes quiméricos entre los bordes del T-DNA. No hay secuencias residuales del T-DNA de *A. tumefaciens* entre los bordes del vector pTDL008.



Los elementos genéticos presentes en la región del T-DNA del vector pTDL008 se describen en el Cuadro 17.

Figura 22. Mapa del plásmido pTDL008.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 23. Diagrama del T-DNA del plásmido pTDL008.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Cuadro 17. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTDL008.

Elemento genético	Tamaño (kb)	Función/ Referencia
RB	0.024	Borde derecho del T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988)
3'me1	0.94	Región 3' no traducida del gen de la enzima 1 málico NADP derivado de <i>Flaveria bidentis</i> , la cual termina la expresión del gen <i>cry1Ab</i> y dirige la poliadenilación (Marshall <i>et al.</i> , 1996)
<i>cry1Ab</i>	1.85	Secuencia codificante de la proteína Cry1Ab derivada <i>Bacillus thuringiensis berliner</i> 1715 (Höfte <i>et al.</i> , 1989)
5'e1	0.06	Secuencia líder 5' no traducida del gen <i>GE1</i> específico del tapetum de <i>Oryza sativa</i> que funciona como promotor del gen <i>cry1Ab</i> (Michiels <i>et al.</i> , 1992).
Ps7s7	1.04	Promotor derivado del segmento 7 del genoma del virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV) con la región promotora duplicada (Boevink <i>et al.</i> , 1995). El promotor Ps7s7 está fusionado a la secuencia líder 5' no traducida del gen <i>GE1</i> específico del tapetum de <i>Oryza sativa</i> (Michiels <i>et al.</i> , 1992) para dirigir una alto nivel de expresión del gen <i>cry1Ab</i> .
P35S3	0.86	Región promotora del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985). El promotor 35S dirige una alta expresión constitutiva del gen <i>bar</i> y es ampliamente usado como promotor para la alta expresión de genes.
<i>Bar</i>	0.55	Secuencia codificante del gen phosphinothricin acetyltransferase derivado de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson <i>et al.</i> , 1987).
3'nos	0.31	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa derivada del plásmido pTiT37 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , la cual termina la expresión del gen <i>bar</i> y dirige la poliadenilación (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
LB	24	Borde izquierdo del T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988)



1.3. Evento GHB119.

Para la obtención del evento GHB119 se utilizó el vector **pTEM12**. Este vector contiene una construcción genética diseñada para ser funcional en plantas de algodón y conferir resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio: terminador 3'nos-gen *bar*-promotor PCsVMV-promotor P35S2-5'cab22L-gen más péptido de tránsito TPssuAt-*cry2Ae*-terminador más borde derecho 3'35S-RB (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

La estructura del vector contiene los siguientes elementos genéticos (

Figura 24 - 25):

- El núcleo del plásmido que contiene el origen de replicación del plásmido pBR322 (Bolívar *et al.*, 1977) para la replicación en *Escherichia coli* (ORI Co1E1) y un fragmento de restricción que contiene el origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.*, 1984) para la replicación en *Agrobacterium tumefaciens* (ORI pVS1).
- Un gen marcador de selección (*aadA*) que confiere resistencia a estreptomycin y espectinomycin para la propagación y selección del plásmido en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.
- Una región de DNA que consiste de un fragmento de neomicin fosfotransferasa que codifica la secuencia del gen *nptII* del transposón Tn903 (Oka *et al.*, 1981).

Estas secuencias son funcionales únicamente en el huésped bacteriano y se ubican fuera de los bordes del T-DNA, por lo tanto, no fueron transferidas al genoma del algodón.

El vector también contiene una región artificial de T-DNA, que consiste en las secuencias de los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988) y sitios de clonación multi-enlace que permiten la inserción de genes quiméricos entre los bordes del T-DNA. No hay secuencias residuales del T-DNA de *A. tumefaciens* entre los bordes del vector pTEM12.

Los elementos genéticos presentes en la región del T-DNA del vector pTEM12 se describen en el

Cuadro 18.

Figura 24. Mapa del plásmido pTEM12.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 25. Diagrama del T-DNA del plásmido pTEM12.



INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Cuadro 18. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTEM12.

Elemento genético	Tamaño (pares de bases)	Función/ Referencia
LB	24	Borde izquierdo del T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988)
3'nos	0.31	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa derivada del plásmido pTiT37 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , la cual termina la expresión del gen <i>bar</i> y dirige la poliadenilación (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
Bar	0.55	Secuencia codificante del gen fosfinothricin acetyltransferase derivado de <i>Streptomyces hygrosopicus</i> (Thompson <i>et al.</i> , 1987).
Pcsmv XYZ	0.53	Secuencia que contiene la región promotora del virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV) (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996). El promotor XYZ del CsVMV es activo en todos los órganos de la planta y tipos de células, lo que sugiere un patrón de expresión constitutiva. Dirige la expresión del gen <i>bar</i> .
P35S2	0.49	Secuencia que incluye la región promotora del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985). El promotor 35S dirige una alta expresión constitutiva del gen <i>cry2Ae</i> y es ampliamente usado como promotor para la alta expresión de genes.
5' cab22L	0.07	Secuencia que contiene la secuencia líder no traducida del gen de la proteína de unión (<i>binding-protein</i>) de la clorofila a/b de <i>Petunia hybrida</i> (Harpster <i>et al.</i> , 1988). Funciona como una secuencia líder muy eficiente en construcciones que incluyen el promotor 35S.
TPssuAt	0.16	Secuencia que codifica el péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa del gen <i>at1sA</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (De Almeida <i>et al.</i> , 1989). Esta secuencia regula el nivel de la proteína codificada en las hojas y dirige la proteína Cry2Ae a los cloroplastos para evitar su degradación en el citoplasma. El péptido de tránsito se encuentra unido a la secuencia líder no traducida de la proteína de unión a la clorofila a/b de <i>Petunia hybrida</i> (5' cab22L).
cry2Ae	1.89	Secuencia modificada que codifica la proteína insecticida del gen de <i>Bacillus thuringiensis</i> adaptado al codón del algodón
3'35S	0.26	Secuencia que incluye la región 3' no traducida del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon <i>et al.</i> , 1991). Termina la expresión del gen <i>cry2Ae</i> y dirige la



		poliadenilación.
RB	0.19	Borde derecho del T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988)

1.4. Evento COT102.

Para introducir el gen de interés en las plantas de algodón se utilizó el plásmido **pCOT1**. El evento COT102 contiene dos genes, *vip3Aa19* y *aph4*. El gen con actividad insecticida *vip3Aa19* se obtuvo de la cepa AB88 de *Bacillus thuringiensis*. Este gen está regulado por el promotor actin-2 derivado de *Arabidopsis*, lo que permite la expresión de la proteína VIP3A en la planta. El gen marcador *aph4*, que codifica para el enzima higromicina-B fosfotransferasa, se obtuvo originariamente de *E. coli* y está regulado por el promotor *ubiquitin-* de *Arabidopsis*. La expresión del gen *aph4* permite el crecimiento de las células transformadas en un medio de crecimiento que contiene higromicina B.

Solamente los elementos genéticos comprendidos entre las regiones del borde izquierdo y derecho del plásmido pCOT1, son los que se transfirieron e integraron en el genoma de la célula de la planta, mientras los elementos genéticos fuera de estas regiones borde, no fueron transferidos. El vector también contiene elementos bien caracterizados de DNA necesarios para la selección y replicación del plásmido en bacterias (Artim *et al.*; 2003¹¹):

- **Spec** (streptomycin adenyltransferase): Gen marcador de selección (*aadA*) derivado del transposon Tn7, que confiere resistencia a eritromicina, estreptomycin y espectinomycin, para la propagación y selección del plásmido en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.
- **VSI Ori**: Origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.*, 1984), el cual funciona como origen de replicación en *Agrobacterium tumefaciens*.
- **RepA**: Proteína de replicación pVSI de *Pseudomonas*.
- **ColEI Ori**: origen de replicación que permite la replicación del plásmido pCOT1 en *Escherichia coli*.

Los elementos genéticos presentes en la región del T-DNA del vector pCOT1 se describen en el las [Figura 26 - 27](#) y en el [Cuadro 19](#).

¹¹ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.



Figura 26. Mapa del plásmido pCOT1.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 27. Diagrama del T-DNA del plásmido pCOT1.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Cuadro 19. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pCOT1.

Elemento genético	Tamaño (kb)	Función/ Referencia
LB	0.025	Borde izquierdo del T-DNA derivado del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988). Los bordes del plásmido se requieren para la transferencia del T-DNA a la célula vegetal, pero no tienen ninguna función en células vegetales.
3'nos	0.254	Terminador de la transcripción derivado del gen de la nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , el cual termina la expresión del gen <i>aph4</i> y dirige la poliadenilación (Bevan <i>et al.</i> , 1983). Esta secuencia no codifica ninguna proteína.
<i>aph4 (hph)</i>	1.025	Gen <i>aph4</i> derivado de <i>Escherichia coli</i> que codifica la enzima hygromycin B phosphotransferase que cataliza la fosforilación de la higromicina (Waldron, 1997; Kaster <i>et al.</i> , 1983)
<i>Ubp3int</i>	1.720	Promotor más el primer intron del gen ubiquitin-3 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Norris <i>et al.</i> , 1993). Este promotor dirige la expresión constitutiva del gen <i>aph4 (hph)</i> .
<i>Act2 (Actin 2)</i>	1.407	Promotor del gen actina-2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> el cual confiere la expresión constitutiva del gen <i>vip3Aa19 (vip3a)</i> . La secuencia del promotor incluye el primer <i>exon</i> y el <i>intron</i> de la secuencia líder no traducida del gen de la actina-2 (An <i>et al.</i> , 1996).
<i>vip3Aa19 (vip3Aa/ vip3a)</i>	2.369	Versión sintética del gen <i>vip3Aa19</i> de la cepa AB88 de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Murray <i>et al.</i> , 1989) que confiere tolerancia a las plantas de algodón a insectos lepidópteros (Estruch <i>et al.</i> , 1996).
3'nos	0.254	Terminador de la transcripción derivado del gen de la nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , el cual termina la expresión del gen <i>vip3Aa19 (vip3a)</i> y dirige la poliadenilación (Bevan <i>et al.</i> , 1983). Esta secuencia no codifica ninguna proteína.
RB	0.025	Borde izquierdo del T-DNA derivado del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Zambryski, 1988). Los bordes del plásmido se requieren para la transferencia del T-DNA a la célula vegetal, pero no tienen ninguna función en células vegetales.



*El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.*

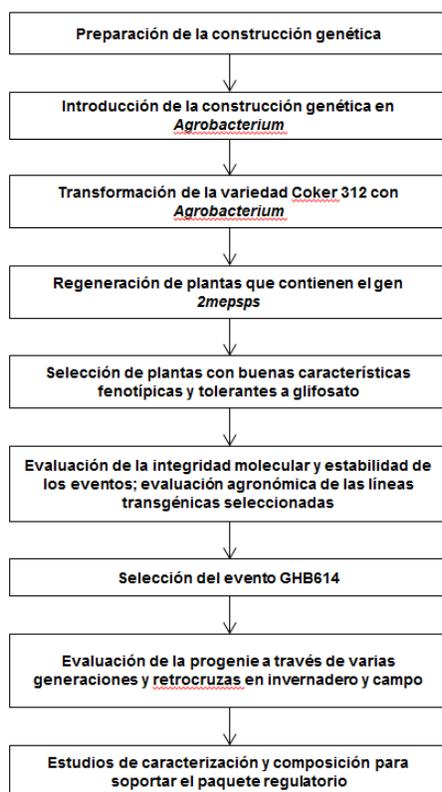
2. Tipo de herencia de los caracteres.

El estudio de estabilidad molecular mediante PCR y el análisis de los datos de segregación, permitieron concluir que los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 segregan de manera independiente siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante.

2.1. Evento GHB614.

El algodón GHB614 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens* como se describe en la sección k.1. La semilla T₁ obtenida de plantas autopolinizadas T₀ que sobrevivieron a la aspersión del herbicida glifosato, fue sembrada en invernadero para incremento de semilla y evaluación. Las plantas T₁ fueron seleccionadas por su tolerancia al glifosato y en cada generación, las plantas de algodón fueron asperjadas con glifosato para eliminar las que no expresaban el gen *2mepsps*. Las plantas homocigóticas T₃ se identificaron plantando 25 semillas y asperjándolas con glifosato para identificar los lotes de semillas segregantes. También se realizó un análisis de homocigosidad basado en PCR, como segundo método para identificar las plantas homocigóticas. La semilla homocigótica T₃ autopolinizada (sin segregación para tolerancia) se utilizó para producir semillas T₄ homocigóticas, y fue el origen de las líneas que se utilizaron en los primeros estudios agronómicos y de estabilidad de la transformación ([Figura 28](#)).

[Figura 28](#). Diagrama del desarrollo del evento GHB614.



Durante el desarrollo del algodón GHB614 el *locus* transgénico fue introgresado en variedades seleccionadas de algodón. Asimismo, se realizaron pruebas de tolerancia al herbicida glifosato bajo condiciones de invernadero a la dosis comercial 1X. Las plantas fueron evaluadas como tolerantes (vivas, sin daño) o susceptibles (dañadas severamente o muertas), 5 - 7 días después de la aplicación del herbicida. Adicionalmente, la confirmación de la presencia del evento de transformación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para fines de mejoramiento genético y confirmación de la herencia del evento GHB614, plantas T₀ fueron cruzadas con algodón convencional y las plantas resultantes F₁ fueron evaluadas en invernadero. El material BC₁F₁ fue sembrado en invernadero y retrocruzado con el mismo parental recurrente (Figura 29). El material BC₂F₁ fue evaluado en invernadero para segregación de la tolerancia. La herencia mendeliana para un *locus* simple predice una planta resistente por cada planta susceptible dentro de las progenies BC₂F₁. Adicionalmente, la progenie BC₂F₂ debería producir 3 plantas resistentes por cada planta susceptible (Cuadro 20). En resumen, todos los datos y análisis realizados indican que el evento GHB614 se comporta como un alelo simple en un *locus* único.

Figura 29. Diagrama del desarrollo del algodón GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Cuadro 20. Análisis de segregación del evento GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2.2. Evento T304-40.

El algodón GHB119 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 315 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens*, como se describe en la sección k.2.

Se llevó a cabo un programa de mejoramiento genético con el propósito de obtener generaciones de semilla adecuada para análisis molecular y caracterización genética del evento, así como la incorporación del evento T304-40 en un programa de mejoramiento convencional para la obtención de variedades de algodón TwinLink™ con tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros.

En la fase inicial de desarrollo, se eligió un número de líneas (plantas) T₀ con potencial y a partir de estas plantas se realizó una serie de autopolinizaciones y selección de plántulas mediante la aspersión de glufosinato de amonio para reducir el número de líneas. Este proceso se repitió hasta la generación T₇. Al final de este proceso se seleccionó la línea con el evento T304-40 con base en su desempeño agronómico y expresión de los dos genes introducidos para programas de mejoramiento comercial (Figura 30).

Figura 30. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2.3. Evento GHB119.

El algodón GHB119 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens*, como se describe en la sección k.3.

Se llevó a cabo un programa de mejoramiento genético con el propósito de obtener generaciones de semilla adecuada para análisis molecular y caracterización genética del evento, así como la incorporación del evento GHB119 en un programa de mejoramiento convencional para la obtención de variedades de algodón TwinLink™ con tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros.

En la fase inicial de desarrollo, se eligió un número de líneas (plantas) T₀ con potencial y a partir de estas plantas se realizó una serie de autopolinizaciones y selección de plántulas mediante la aspersión de glufosinato de amonio para reducir el número de líneas. Este proceso se repitió hasta la generación T₇. Al final de este proceso se seleccionó la línea con el evento GHB119 con base en su desempeño agronómico y expresión de los dos genes introducidos para programas de mejoramiento comercial

Figura 31. Diagrama del desarrollo del algodón GHB119.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



2.4. Evento T304-40 x GHB119.

El algodón T304-40 x GHB119 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales individuales T304-40 y GHB119 como se ilustra en la [Figura 32](#). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

La semilla T₁ fue obtenida de la autopolinización de las plantas T₀ de los eventos de transformación T304-40 y GHB119 que sobrevivieron a la prueba de invernadero de aspersión de glufosinato de amonio. Las plantas T₁ fueron seleccionadas por su tolerancia al glufosinato de amonio y en cada generación, las plantas de algodón fueron asperjadas con este herbicida para eliminar las que no expresaban el gen *bar*. Las plantas homocigóticas T₃ se identificaron plantando 25 semillas y asperjándolas con glufosinato de amonio para identificar los lotes de semillas segregantes. También se realizó un análisis de homocigosidad basado en PCR, como segundo método para identificar las plantas homocigóticas.

La semilla homocigótica T₃ autopolinizada (sin segregación para tolerancia) se utilizó para producir semillas T₄ homocigóticas, y fue el origen de las líneas que se utilizaron en los primeros estudios agronómicos y de estabilidad de la transformación (2005). Plantas T₆ y T₇ autopolinizadas fueron utilizadas para estudios agronómicos en 2007 y 2008. La semilla T304-40 x GHB119 (plantas F₂ individuales), fueron analizadas mediante PCR para confirmar la presencia de ambos eventos, llevadas a madurez, cosechadas (2007) y autopolinizadas para producir semilla para estudios de campo en 2008.

La generación BC₂F₄ (homocigótica) fue utilizada para estudios de caracterización del inserto y determinación de niveles de expresión de proteínas. Las generaciones T₃, T₄, T₅, T₆ y BC₂F₂ fueron utilizadas para análisis de estabilidad molecular. La generación T₅ fue usada para análisis de composición. Las generaciones T₅ y BC₂F₃ fueron usadas para ensayos agronómicos de campo. La generación T₇ fue usada para análisis de ausencia/presencia de secuencias derivadas del esqueleto del vector.

Durante el desarrollo del algodón T304-40 x GHB119, cada *locus* fue introgresado en variedades de algodón seleccionadas. Asimismo, se realizaron pruebas de tolerancia al herbicida glufosinato de amonio bajo condiciones de invernadero a la dosis comercial del producto. Las plantas fueron evaluadas como tolerantes (vivas, sin daño) o susceptibles (dañadas severamente o muertas), 5 - 7 días después de la aplicación del herbicida. Adicionalmente, la confirmación de la presencia del evento de transformación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para demostrar la herencia independiente de los eventos T304-40 y GHB119 se analizaron los datos de segregación de la progenie F₂. Los dos eventos fueron retrocruzados de manera independiente con una línea de algodón convencional. En la generación BC₂F₁ los dos eventos fueron combinados y la progenie de esta F₁ fue analizada para homocigosidad mediante PCR diseñada para identificar la cigocidad en cada planta F₂ individual. En las plantas individuales se analizó la presencia o ausencia de los eventos, lo cual permitió identificar cuatro posibles genotipos WT (tipo silvestre)/WT, T304-40/WT, GHB119/WT y T304-40/GHB119 ([Cuadro 21](#)). 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 DNA, caracterizando a los eventos individuales y demostrando la estabilidad de los transgenes.



Cuadro 21. Análisis de segregación del algodón T304-40 x GHB119.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 32. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40 x GHB119 (TwinLink™).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2.5. Evento COT102.

La estabilidad del evento COT102 fue analizada utilizando plantas de cinco generaciones. Plantas individuales de las generaciones F₁, BC₁F₂, BC₂F₁, BC₂F₂ y BC₃F₁ (

Figura 33) fueron analizadas para determinar la expresión de la proteína Vip3Aa19 (VIP3/VIP3A) mediante en ensayo cualitativo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) (Cuadro 22).

Todas las generaciones segregaron como se esperaba para un sitio de inserción único. La progenie F₁ fue producida a partir de una población homocigota y, como se esperaba, todas las plantas expresaron la proteína Vip3Aa19. Las otras cuatro generaciones evaluadas produjeron los resultados esperados con relación a la expresión de la proteína Vip3Aa19. El valor crítico de Ji cuadrada para rechazar la hipótesis nula fue de 3.84 (p=0.05) con un grado de libertad (Strickberger, 1976)¹². Un valor menor a 3.84 indica que la herencia del gen *vip3Aa19* se comporta siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante. El sitio de inserción permanece estable a través de múltiples generaciones de autopolinización y retrocruzas (Artim *et al.*, 2003).

Figura 33. Mapa de las generaciones del evento COT102 utilizadas para estudios de estabilidad genética.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Cuadro 22. Datos de segregación de la progenie del evento COT102.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

El evento COT102 (SYN-IR102-7) es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento COT102 sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

¹² Los valores mayores al valor crítico se presentarían una vez en veinte oportunidades si la hipótesis es correcta.



2.6. Algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).

El algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614, T304-40 x GHB119 y COT102 como se ilustra en la [Figura 34](#). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

[Figura 34](#). Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

3. Expresión de proteínas y su localización.

La medición de la expresión génica se puede determinar mediante la cuantificación directa del producto del gen, que en general es una proteína. Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 fueron determinados mediante la técnica de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) y analizados estadísticamente en raíz, hoja, cuadros, bellotas, polen y semilla de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V6, inicio de cuadros, floración y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos (Georgia, Arkansas y Texas), durante el ciclo 2013 ([INFORMACIÓN CONFIDENCIAL](#)). Los resultados de la determinación del nivel de expresión de las proteínas se presentan en los [Cuadros 23 - 28](#).

[Cuadro 23](#). Niveles de expresión de la proteína **Cry1Ab** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Cry1Ab (µg/g peso seco)		Cry1Ab (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	12.70 ± 4.02	5.68 - 18.39	2.93 ± 0.79	1.77 - 3.87
	Raíz	9.05 ± 2.26	5.10 - 11.74	1.94 ± 0.38	1.46 - 2.49
Inicio de cuadros	Hoja	16.37 ± 6.05	6.67 - 26.26	3.41 ± 1.38	1.42 - 5.74
Floración	Polen	NA	NA	0.13 ± 0.09	0.04 - 0.29
2 semanas después de primera flor	Hoja	6.12 ± 1.80	3.62 - 10.29	1.72 ± 0.57	0.97 - 3.15
	Cuadros	7.66 ± 1.51	5.30 - 10.49	1.69 ± 0.26	1.34 - 2.25
	Bellotas	5.64 ± 1.44	2.95 - 7.65	0.95 ± 0.24	0.56 - 1.27
	Planta completa	5.30 ± 3.32	0.71 - 10.55	1.51 ± 0.93	0.19 - 3.10
Madurez	Semilla	3.94 ± 0.74	2.98 - 5.32	3.41 ± 0.59	2.56 - 4.33

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 24. Niveles de expresión de la proteína **Cry2Ae** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Cry2Ae (µg/g peso seco)		Cry2Ae (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	152.34 ± 45.64	96.54 – 252.90	35.76 ± 10.53	21.95 - 52.34
	Raíz	12.26 ± 3.64	7.25 - 17.21	2.74 ± 1.09	1.55 - 4.28
Inicio de cuadros	Hoja	165.61 ± 56.59	94.01 - 233.28	33.88 ± 10.98	20.25 - 49.55
Floración	Polen	NA	NA	0.13 ± 0.06	0.05 - 0.29
2 semanas después de primera flor	Hoja	101.42 ± 16.45	78.61 - 133.41	28.39 ± 5.24	20.60 - 37.63
	Cuadros	29.99 ± 10.73	19.56 - 55.03	6.86 ± 3.07	4.05 - 14.17
	Bellotas	17.98 ± 4.92	11.11 - 30.29	3.06 ± 0.94	1.72 - 5.46
	Planta completa	77.82 ± 24.79	55.43 - 137.79	22.27 ± 7.12	13.72 - 39.42
Madurez	Semilla	21.38 ± 2.37	18.14 - 25.34	18.55 ± 2.17	15.56 - 21.81

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.

Cuadro 25. Niveles de expresión de la proteína **Vip3Aa19** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Vip3Aa19 (µg/g peso seco)		Vip3Aa19 (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	167.54 ± 72.47	77.74 - 271.57	37.11 ± 11.63	25.59 - 57.62
	Raíz	74.53 ± 22.90	30.56 - 101.67	15.70 ± 3.52	8.46 - 20.79
Inicio de cuadros	Hoja	312.49 ± 69.47	211.68 - 416.78	64.26 ± 14.03	45.93 - 87.31
Floración	Polen	NA	NA	0.42 ± 0.09	0.29 - 0.57
2 semanas después de primera flor	Hoja	91.66 ± 20.32	60.65 - 118.37	25.69 ± 6.16	15.26 - 31.93
	Cuadros	71.83 ± 16.58	38.16 - 90.87	15.82 ± 2.87	9.83 - 19.47
	Bellotas	62.62 ± 15.91	44.42 - 91.51	10.63 ± 2.91	7.08 - 15.53
	Planta completa	63.59 ± 26.43	29.57 - 116.24	17.78 ± 6.70	9.82 - 34.10
Madurez	Semilla	6.69 ± 1.25	5.02 - 8.86	5.79 ± 1.01	4.34 - 7.45

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 26. Niveles de expresión de la proteína **2mEPSPS** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	2mEPSPS (µg/g peso seco)		2mEPSPS (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	337.59 ± 68.93	251.53 - 447.39	80.89 ± 22.74	48.50 - 110.11
	Raíz	82.86 ± 14.95	49.70 - 103.18	17.75 ± 1.76	14.18 - 20.81
Inicio de cuadros	Hoja	1519.53 ± 478.40	659.30 - 2068.93	315.86 ± 111.11	140.20 - 453.21
Floración	Polen	NA	NA	5.96 ± 3.63	1.38 - 12.70
2 semanas después de primera flor	Hoja	452.3 ± 125.62	340.80 - 785.88	125.57 ± 31.80	96.66 - 206.19
	Cuadros	313.13 ± 60.14	242.45 - 418.57	69.30 ± 10.07	57.08 - 89.69
	Bellotas	127.73 ± 17.10	101.49 - 156.75	21.51 ± 2.56	18.01 - 25.76
	Planta completa	240.63 ± 99.08	122.26 - 425.44	68.31 ± 27.98	40.57 - 121.70
Madurez	Semilla	123.25 ± 9.53	105.44 - 133.25	106.78 ± 7.94	95.09 - 119.67

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.

Cuadro 27. Niveles de expresión de la proteína **PAT/bar** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	PAT/bar (µg/g peso seco)		PAT/bar (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	557.04 ± 60.87	435.82 - 650.48	141.21 ± 63.01	84.57 - 281.95
	Raíz	273.54 ± 71.48	183.73 - 382.20	58.34 ± 9.74	43.79 - 72.38
Inicio de cuadros	Hoja	1425.41 ± 495.75	836.31 - 2210.67	288.57 ± 84.15	182.56 - 435.60
Floración	Polen	NA	NA	0.70 ± 0.52	0.17 - 1.66
2 semanas después de primera flor	Hoja	900.52 ± 284.91	527.54 - 1373.43	250.66 ± 78.49	145.75 - 360.34
	Cuadros	1141.01 ± 319.25	738.50 - 1544.70	250.59 ± 56.35	176.79 - 324.06
	Bellotas	423.67 ± 77.84	324.57 - 547.88	71.32 ± 12.06	52.83 - 87.82
	Planta completa	475.65 ± 112.84	280.49 - 653.81	134.86 ± 28.10	93.09 - 191.80
Madurez	Semilla	259.44 ± 27.46	204.28 - 294.51	224.65 ± 22.11	184.20 - 252.71

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 28. Niveles de expresión de la proteína **APH4** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	APH4 (µg/g peso seco)		APH4 (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	ND	<LLOQ	ND	<LLOQ
	Raíz	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
Inicio de cuadros	Hoja	0.65 ± 0.12 ^a	<LOQ – 0.80	0.12 ± 0.02 ^a	<LOD – 0.15
Floración	Polen	NA	NA	ND	<LOD - <LLOQ
2 semanas después de primera flor	Hoja	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Cuadros	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Bellotas	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Planta completa	ND	<LOD	ND	<LOD
Madurez	Semilla	ND	<LOD ^b	ND	<LOD ^b

Muestras con cantidades no cuantificables de la proteína APH4 estuvieron por debajo del límite de detección (<LOD) o por debajo del límite menor de cuantificación (LLOQ) y no fueron determinadas (ND). NA = No Aplicable.

^a La media y desviación estándar (SD) para peso seco y peso fresco se basan en un total de 6 repeticiones para dos ensayos, el resto de los sitios fueron no cuantificables (<LLOQ o <LOD).

^b El rango para peso seco y peso fresco se basa en un total de 11 repeticiones de tres ensayos.

k) Descripción del método de transformación.

1. Evento GHB614.

El algodón GHB614 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el vector pTEM2. Este vector contiene una construcción quimérica única del gen, diseñada para ser funcional en plantas y conferir tolerancia al herbicida glifosato: Ph4a748A -intron1h3At- TPotpC::2mepsps::3'histon4At.

El sistema de transformación con *A. tumefaciens* ha sido ampliamente estudiado y se ha empleado como herramienta biotecnológica rutinaria para el desarrollo de plantas transgénicas durante muchos años. *A. tumefaciens* es una bacteria fitopatógena que habita de manera natural en el suelo, la cual utiliza un proceso de ingeniería genética natural para alterar la maquinaria metabólica de las células de la planta hospedante (Tempé *et al.*, 1977; Chilton *et al.*, 1977). Esta bacteria, además de su cromosoma circular, posee un plásmido de aproximadamente 200 kilobases denominado plásmido Ti (del inglés *tumor-inducing*). Este plásmido contiene una secuencia bien definida de DNA de aproximadamente 35 kilobases y delimitada hacia ambos extremos por una franja repetida de 25 pares de bases, llamada T-DNA (del inglés *Transferred DNA*, DNA transferido). Asimismo, en otra parte del plásmido, fuera de la región del T-DNA, se halla la región *vir* que interviene en la transducción de señales en la bacteria y en la regulación del proceso de transferencia del T-DNA (Zambryski, 1988). La comprensión de este proceso natural de transformación y el hecho de que cualquier DNA externo colocado entre los bordes del T-DNA puede ser transferido e integrado de manera estable dentro del cromosoma de las células



vegetales, ha permitido la construcción de vectores para la transformación genética de varias especies de plantas (Deblaere *et al.*, 1985; Hooykaas & Shilperoort, 1992).

Los *explantos* derivados del algodón Coker 312 fueron expuestos a un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el plásmido pTEM2. Después del co-cultivo, las células de algodón fueron regeneradas mediante cultivo de tejidos hasta producir una planta completa. El medio de cultivo fue adicionado con 500 mg/L de claforan para eliminar las bacterias remanentes (FSANZ, 2008¹³). La actividad de la proteína expresada por el gen *2mepsps* introducido fue confirmada asperjando las plántulas de algodón con el herbicida glifosato. Las plántulas sobrevivientes se cultivaron en invernadero y después se seleccionaron en base a su resistencia al glifosato. La progenie fue autopolinizada y las plantas homocigotas fueron retrocruzadas con el parental recurrente para obtener material homocigótico para análisis posteriores (verificación del inserto por *Southern Blot* o PCR), o cruzadas con germoplasma elite en programas de mejoramiento genético para desarrollar nuevas variedades de algodón tolerantes a glifosato (sección j.2).

2. Evento T304-40.

El algodón T304-40 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 315 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens* (Cousins *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1999), utilizando el vector pTDL008.

Los *explantos* de cotiledones de plántulas germinadas *in vitro* derivadas de la variedad Coker 315, fueron co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA 101 que contenía un sistema de vectores binario (Deblaere *et al.*, 1987). Después del co-cultivo, los tejidos de algodón fueron cultivados en un medio selectivo con glufosinato de amonio. Al medio se le adicionó claforan para eliminar los residuos de *A. tumefaciens*. Una vez formado, el callo fue transferido a un medio de regeneración con glufosinato de amonio para desarrollo y selección de embriones somáticos. Las plántulas obtenidas (T₀) se transfirieron a invernadero y una vez que se comprobó su tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, se cultivaron para la producción de semillas. Las plantas de la generación T₀ fueron autopolinizadas y seleccionadas mediante la aspersión de glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros durante siete generaciones (T₇). Asimismo, las plantas T₀ fueron cruzadas con algodón convencional para obtener líneas homocigóticas estables (BC₃F₃), las cuales se cruzaron con el evento GHB119 para desarrollar el algodón TwinLink™ (sección j.2).

3. Evento GHB119.

El algodón GHB119 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens* (Deblaere *et al.*, 1987), utilizando el vector pTEM12.

Los callos embriogénicos derivados de explantes de hipocótilos del algodón Coker 312 germinados *in vitro* fueron co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1^R que contenía el vector pTEM12. Después del co-cultivo, los tejidos de algodón fueron cultivados en un medio selectivo con glufosinato de amonio. Al medio se le adicionó claforan (250 o 125 mg/L) para eliminar los residuos de *A. tumefaciens*. Una vez formado, el callo fue transferido a un medio de regeneración con glufosinato de amonio para desarrollo y selección de embriones somáticos. Las

¹³ Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). 2008. Final assessment report. Application A614. Food derived from glyphosate-tolerant cotton line GHB614.



plántulas obtenidas (T_0) se transfirieron a invernadero y una vez que se comprobó su tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, se cultivaron para la producción de semillas. Las plantas de la generación T_0 fueron autopolinizadas y seleccionadas mediante la aspersión de glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros durante siete generaciones (T_7). Asimismo, las plantas T_0 fueron cruzadas con algodón convencional para obtener líneas homocigóticas estables (BC_3F_3), las cuales se cruzaron con el evento T304-40 para desarrollar el algodón TwinLink™ (sección j.2).

4. Evento COT102.

El evento de transformación COT102 se obtuvo mediante transformación por *Agrobacterium* de plantas de la variedad Coker 312. La transformación se realizó incubando células de *Agrobacterium*, conteniendo el vector de transformación pCOT1, con tejido de hipocótilo de algodón y subsecuente cultivo en placa del tejido en un medio sintético conteniendo higromicina B. Las plantas fueron regeneradas y analizadas individualmente para comprobar la presencia del gen *vip3Aa* mediante PCR y mediante la bio-actividad insecticida. Las plantas transformadas T_0 fueron autopolinizadas para producir semilla T_1 , de la generación T_1 se seleccionó una única planta homocigótica que se designó evento COT102.

*El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.*

5. Algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).

El algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614, T304-40 x GHB119 y COT102 como se ilustra en la [Figura 35](#). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

[Figura 35](#). Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



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

Los análisis bio-informáticos, *Southern Blot* y PCR realizados en los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 demostraron que se integró únicamente una copia del T-DNA de los *cassettes* de expresión y no se detectaron elementos del esqueleto de los vectores (plásmidos), ni secuencias adicionales que pudieran tener alguna función biológica.

1. Evento GHB614.

1.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.

El DNA genómico aislado del algodón GHB614 y de la variedad convencional Coker 312 fue sometido a análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (promotor Ph4a748At-intron1h3At+TPotpC::2mepsps::terminador histonAt), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas. Los resultados de este análisis demuestran la presencia de un fragmento de integración 5' y un fragmento de integración 3', lo cual permite concluir que se integró únicamente una copia intacta del T-DNA del plásmido pTEM2 en el algodón GHB614 (Scott *et al.*, 2006¹⁴). La metodología y resultados del análisis *Southern blot* sobre la integridad del inserto y número de copias, se describen previamente en la **sección i.2.**

1.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.

Para demostrar la estabilidad del evento GHB614, muestras de DNA genómico de obtenido a partir de plantas individuales de múltiples generaciones y diferentes fondos genéticos fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene un sitio de reconocimiento en el T-DNA. La hibridación del DNA del algodón GHB614 digerido con *EcoRV* con la sonda Ph4a748At + intron1 h3At + TPotp C demostró la presencia de los fragmentos de integración esperados en todas las muestras analizadas. Estos fragmentos de integración representan las uniones entre las secuencias transgénicas y las secuencias de DNA de la planta, lo cual permite concluir la estabilidad del evento GHB614 a nivel genómico a través de varias generaciones. Adicionalmente, los datos de segregación también confirman la estabilidad del inserto y muestran que segrega siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante.

1.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.

El gen de interés *2mepsps* también fue utilizado como gen marcador y, por lo tanto, no se utilizó ningún otro gen marcador adicional. El evento GHB614 no contiene secuencias del esqueleto del plásmido, lo cual se evidenció utilizando sondas cubriendo la secuencia completa del esqueleto del vector pTEM2 (incluyendo los elementos *aadA*, ORI pSV1 y ORI ColE1). Tampoco se transfirió ningún origen de replicación bacteriano con el sistema de transformación *Agrobacterium* al genoma del algodón como resultado de la transformación.

¹⁴ Scott, A.; Van Duyn, G.; Freyssinet, M.; Poe, M.; Trolinder, L. 2006. Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol™ cotton Event GHB614 OECD Unique Identifier BCS-GHØØ2-5. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC, USA.



1.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.

La verificación molecular de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector pTEM2 en el algodón GHB614 y Coker 312 (convencional) se realizó mediante análisis *Southern blot*, utilizando cinco sondas cubriendo la secuencia total del esqueleto del vector. Los tamaños de algunos fragmentos de hibridación pueden ser estimados por la localización de los sitios de corte de las enzimas de restricción en el DNA insertado. Después de la hibridación, las membranas fueron separadas de las sondas del esqueleto del vector y re-hibridadas con la sonda del T-DNA (PT006) para demostrar que se cargó suficiente DNA genómico del algodón GHB614 en los geles. Las muestras de los controles positivos mostraron los fragmentos de hibridación esperados de 9131 bp. No se detectaron fragmentos de hibridación en los carriles correspondientes a las muestras de algodón convencional Coker 312 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

- *EcoRV* corta una vez en la secuencia insertada del algodón GHB614, por lo tanto, se esperan dos fragmentos de integración después de la hibridación del DNA genómico del algodón GHB614 digerido con *EcoRV*, con la secuencia del T-DNA. El fragmento de integración 5' debe ser mayor de 891 bp y el fragmento de integración 3' debe ser mayor de 3141 bp. El DNA genómico del algodón GHB614 digerido con *EcoRV* muestra dos fragmentos de integración: 4800 ± 50 bp y 9000 ± 200 bp. De análisis previos se conoce que el fragmento de 4800 ± 50 bp corresponde al fragmento 5', mientras que el fragmento 9000 ± 200 bp se deriva del fragmento 3'.
- No hay secuencia de reconocimiento para *NotI* en el DNA genómico del algodón GHB614, por lo tanto, se espera únicamente un fragmento de integración después de la hibridación del DNA genómico de GHB614 digerido con *NotI*, con la secuencia del T-DNA. En consecuencia únicamente se observa un fragmento de hibridación mayor de 14 Kb.

En la [Figura 36](#) se presenta un esquema de los fragmentos de restricción y la posición de las sondas utilizadas. Asimismo, en el [Cuadro 29](#) se presentan los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación.

[Figura 36](#). Esquema del vector pTEM2 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Cuadro 29](#). Resumen de los resultados de hibridación que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Sonda PT001

En el DNA del control positivo, se observó el fragmento esperado *NotI* de 9131 bp. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón GHB614 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 (control negativo) ([Figura 37](#)).



Sonda PT002

En el DNA del control positivo digerido con *NotI*, se observaron los fragmentos esperados de 1290 bp, 1532 bp y 9131 bp. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón GHB614 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 (Figura 38).

Sonda PT003

El control positivo pTEM2 – *NotI* mostró los fragmentos esperados de 1290 bp y 1532 bp. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón GHB614 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 (Figura 39).

Sonda PT004

No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón GHB614 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312. Los fragmentos esperados de 1532 bp y 9131 bp son visibles en las muestras del control positivo (Figura 40).

Sonda PT005

El control positivo muestra el fragmento de hibridación esperado de 9131 bp. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón GHB614 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 (Figura 41).

Los resultados del análisis *Southern blot* utilizando sondas que cubren la secuencia completa del esqueleto del vector pTEM2, demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón GHB614.

Figura 37. Análisis *Southern blot* del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT001 y T-DNA (PT006).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 38. Análisis *Southern blot* del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT002 y T-DNA (PT006).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 39. Análisis *Southern blot* del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT003 y T-DNA (PT006).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 40. Análisis *Southern blot* del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT004 y T-DNA (PT006).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Figura 41. Análisis *Southern blot* del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT005 y T-DNA (PT006).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

1.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.

Fragmento de integración de los bordes derecho e izquierdo.

El análisis *Southern blot* demostró que el algodón GHB614 tolerante a glifosato contiene únicamente una copia del T-DNA del plásmido pTEM2. Asimismo, se determinó la secuencia del *locus* transgénico, la secuencia del *locus* de pre-inserción y las secuencias flanqueantes 5' y 3'. En el análisis *Southern blot*, la membrana que contenía cantidades equimolares de DNA preparado a partir de material foliar fue subsecuentemente hibridado con las secuencias flanqueantes 5' y 3' y la sonda *2mepsps*. Los fragmentos de hibridación pudieron ser observados en las diferentes muestras de DNA después de la hibridación con las secuencias flanco 5' y 3, lo cual demostró que el origen de las secuencias flanco del evento GHB614 es la planta de algodón (*Gossypium hirsutum*). Posteriormente, la identidad del evento GHB614 fue confirmada mediante hibridación con la sonda *2mepsps*.

Adicionalmente, se realizó un análisis PCR utilizando pares de *primers* dirigidos a las secuencias flanco 5' y 3' del evento GHB614. También se incluyeron en la reacción *primers* dirigidos a secuencias de tRNA del cloroplasto que sirvieron como control interno. En la primera reacción de PCR, los *primers* que amplifican las secuencias flanco se utilizaron para demostrar la naturaleza de las secuencias y en la segunda reacción, se demostró la especificidad de los fragmentos de integración 5' y 3'. Los resultados obtenidos de los análisis PCR demostraron que el origen de las secuencias flanco 5' y 3' del evento GHB614 es la planta de algodón (*Gossypium hirsutum*) (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL).

Búsqueda de similitud de secuencias (BLASTn) y marcos de lectura abiertos.

El evento de algodón GHB614 fue obtenido mediante la inserción del T-DNA del vector PTEM2 en el genoma de la planta de algodón Cocker 312, utilizando el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium*. Debido a la inserción del *cassette* de expresión del gen *2mepsps* en el algodón, se crea un sitio de inserción con extremos 5' y 3' en donde se inserta el T-DNA y se fusiona con el DNA genómico del algodón. Las regiones de unión se analizaron para confirmar que ningún gen importante del algodón fue interrumpido y que ninguna proteína quimérica se expresa debido a la inserción.

Para predecir la presencia potencial de nuevas secuencias codificantes en las regiones de unión 5' y 3', se utilizaron herramientas de búsqueda de genes y marcos de lectura abiertos (ORF). Como resultado de la búsqueda se detectaron dos ORF en la región 5' y ninguno en la región 3'. Los resultados de análisis *in silico* del ORF1 putativo y del ORF2, identificados en el algodón GHB614, no revelaron ninguna similitud con toxinas o alérgenos conocidos de acuerdo con el siguiente criterio:



Similitud con alérgenos:

1. Una similitud de 100% sobre un segmento lineal de 8 aminoácidos contiguos.
2. Una similitud de 35% con un alérgeno conocido con un valor esperado (E) <0.1 (BLASTn).

Similitud con toxinas:

1. Una similitud de 35% con una toxina conocida con un valor esperado (E) <0.1 (BLASTn).

2. Evento T304-40.

2.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.

El DNA genómico aislado del algodón T304-40 y de la variedad convencional FiberMax® 966 fue sometido a análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (promotor *5'e1-Ps7s7ter*, gen *cry1Ab*, terminador *3'me1*, promotor *P35S3*, gen *bar*, terminador *3'nos*), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas. Los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con seis sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética, o la sonda del T-DNA completo. Los resultados de este análisis demostraron que únicamente una copia casi completa del T-DNA, flanqueada por una copia incompleta invertida del *cassette* del gen *cry1Ab* y un terminador *3'me1* adicional, fueron transferidos al algodón T304-40 (Scott *et al.*, 2008¹⁵). La metodología y resultados del análisis *Southern blot* sobre la integridad del inserto y número de copias, se describen previamente en la **sección i.2.**

2.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.

Para demostrar la estabilidad estructural del evento T304-40, se prepararon muestras de DNA genómico a partir de plantas individuales de cuatro cultivares diferentes, de cuatro generaciones y cultivadas bajo condiciones ambientales diferentes en tres localidades. El DNA aislado fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el fragmento de DNA integrado. Analizando el DNA del evento T304-40 digerido con la enzima *EcoRV* con la sonda del gen *cry1Ab*, se demostró la presencia de los tres fragmentos esperados en todas las muestras analizadas. Dos de estos fragmentos representan la unión entre las secuencias transgénicas y el DNA de la planta de algodón y el tercero representa un fragmento interno. Los resultados obtenidos demostraron la estabilidad genética del evento T304-40 a través diferentes generaciones, diferentes variedades y cultivadas en ambientes diferentes. Adicionalmente, los datos de segregación también confirmaron la estabilidad del inserto y demostraron que éste segrega como un *locus* mendeliano dominante.

¹⁵ Scott, A.; Bushey, D.; Freyssinet, M.; Poe, M.; Rinehardt, M. 2008. 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-GHØ4-7 x BCS-GHØ5-8. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC, USA.



2.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.

El marcador de selección utilizado fue el gen *bar* que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y, por lo tanto, no se utilizó ningún gen marcador adicional. El algodón T304-40 no contiene secuencias del esqueleto del vector, lo cual fue demostrado mediante análisis *Southern blot* utilizando siete sondas cubriendo la secuencia completa del esqueleto del vector pTDL008 (incluyendo las secuencias *aadA*, ORI pSV1 y ORI ColE1). Asimismo, no se transfirió ningún origen de replicación bacteriano como resultado de la transformación del algodón con el sistema mediado por *Agrobacterium*.

2.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.

El algodón T304-40 no contiene secuencias del esqueleto del vector pTDL008, lo cual fue demostrado mediante análisis *Southern blot*, para este análisis el DNA genómico aislado de plantas de algodón T304-40 fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRV* o *NotI* y se utilizaron siete sondas que cubren la secuencia completa del esqueleto del vector pTDL008. El control positivo fue evaluado con la sonda completa del T-DNA.

La ausencia de señales de hibridación con las sondas del esqueleto del vector demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto, mientras que la hibridación del control positivo, asegura que las condiciones experimentales para el análisis *Southern blot* fueron adecuadas para permitir la detección los fragmentos de DNA integrados (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

En la [Figura 42](#) se presenta un esquema de los fragmentos de restricción y la posición de las sondas utilizadas. Asimismo, en el [Cuadro 30](#) se presentan los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación.

[Figura 42](#). Esquema del vector pTEM2 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Cuadro 30](#). Resumen de los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación, que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón T304-40.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Figura 43](#). Resultados del análisis *Souther blot* – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón T304-40.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Figura 44](#). Resultados del análisis *Souther blot* – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón T304-40 (continuación).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



2.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.

Fragmento de integración de los bordes derecho e izquierdo.

Los resultados del análisis *Southern blot* demostraron que únicamente una copia casi completa del T-DNA, flanqueada por una copia incompleta invertida del *cassette* del gen *cry1Ab* y un terminador *3'me1* adicional, fueron transferidos al algodón T304-40 (sección i.2).

La secuencia del *locus* de pre-integración, así como las secuencias flanco 5' y 3' fue determinada mediante análisis PCR, utilizando DNA genómico del algodón convencional como plantilla y un par de *primers* específicos para las secuencias flanco 5' y 3', lo cual permitió determinar 837 bp correspondientes al *locus* de pre-integración, incluyendo 480 bp de la secuencia flanco 5', 325 bp de la secuencia flanco 3' y un sitio de delección de 32 bp. Este sitio de delección detectado entre las secuencias 5' y 3' del *locus* de pre-integración, no está presente en el *locus* transgénico del evento T304-40 debido a que fue eliminado durante el proceso de transformación (Moens & De Pestel, 2008¹⁶).

Las secuencias flanco 5' y 3' del *locus* transgénico fue determinada analizando DNA genómico del algodón T304-40 y algodón convencional. Para este análisis se amplificaron dos fragmentos mediante PCR utilizando DNA genómico del algodón T304-40 como plantilla. El *locus* de pre-inserción pudo ser amplificado en un fragmento usando DNA genómico del algodón convencional como plantilla. Después de la secuenciación de todos los fragmentos de PCR, se obtuvo una secuencia consenso a partir de los dos fragmentos de integración y el *locus* transgénico, como se describe en Moens & De Pestel (2008). Asimismo, se obtuvo una secuencia consenso en el sitio de pre-inserción del algodón convencional.

La secuencia del *locus* transgénico determinada contiene 1185 bp para la secuencia flanco 5', 9056 para el inserto transgénico y 1228 para la secuencia flanco 3'. En el *locus* de pre-inserción se determinaron 2507 bp, incluyendo 1185 bp para la secuencia flanco 5', 1290 bp para la secuencia flanco 3' y un sitio de delección de 32 bp. Las secuencias flanco 5' y 3' de 1185 bp y 1228 bp del algodón T304-40 son idénticas a las secuencias flanco del algodón convencional. Esto demuestra que el origen de las secuencias flanco del evento T304-40 es la planta de algodón (*Gossypium hirsutum*) (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

Búsqueda de similitud de secuencias (BLASTn) y marcos de lectura abiertos.

El evento T304-40 se obtuvo utilizando el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* para insertar el T-DNA del vector TDL008 en el genoma del algodón. Debido al proceso de inserción del *cassette* de expresión *cry1Ab - bar*, se generaron sitios de unión 5' y 3' del T-DNA con el genoma del algodón. Estos sitios de unión fueron analizados para confirmar que ningún gen importante del algodón fue interrumpido y que ninguna proteína quimérica se expresa debido a la inserción.

Para predecir la presencia potencial de nuevas secuencias codificantes en las regiones de unión 5' y 3', se utilizaron herramientas de búsqueda de genes y marcos de lectura abiertos (ORF). No se detectaron ORF en ninguno de los sitios de unión, se detectó un promotor putativo en la secuencia

¹⁶ Moens, S.; De Pestel, K. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40. Bayer BioScience N.V. Belgium. BBS08-002.



flanqueante 5', sin embargo, como no se encontraron genes adicionales en dirección hacia abajo, es muy probable que este promotor no tenga ninguna función biológica.

3. Evento GHB619.

3.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.

El DNA genómico aislado del algodón GHB119 y de la variedad convencional FiberMax® 966 fue sometido a análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (terminador 3'nos, gen *bar*, promotor PCsVMV, promotor P35S2-5'cab22L, gen más péptido de tránsito TPssuAt-*cry2Ae*, terminador más borde derecho 3'35S-RB), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas. Los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con seis sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética, o la sonda del T-DNA completo. Los resultados de este análisis demuestran que únicamente una copia completa del T-DNA fue integrada en el algodón GHB119 y que el DNA transferido al algodón corresponde a la misma configuración diseñada en el vector de transformación (Scott *et al.*, 2008¹⁷).

3.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.

Para demostrar la estabilidad estructural del evento GHB119, se prepararon muestras de DNA genómico a partir de plantas individuales de dos fondos genéticos diferentes, de tres generaciones consecutivas y cultivadas bajo condiciones ambientales diferentes en seis localidades, las cuales fueron analizadas por *Southern blot*. El DNA aislado fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el fragmento de DNA integrado. La hibridación de las muestras con la sonda del T-DNA reveló el perfil esperado en todas las muestras. Los resultados obtenidos demostraron la estabilidad genética del evento T304-40 a través diferentes generaciones, diferentes variedades y cultivadas en ambientes diferentes. Adicionalmente, los datos de segregación también confirmaron la estabilidad del inserto y demostraron que éste segrega como un *locus* Mendeliano dominante.

3.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.

El marcador de selección utilizado fue el gen *bar* que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y, por lo tanto, no se utilizó ningún gen marcador adicional. El algodón GHB119 no contiene secuencias del esqueleto del vector, lo cual fue demostrado mediante análisis *Southern blot* utilizando cinco sondas de traslape, cubriendo la secuencia completa del esqueleto del vector pTEM12. Asimismo, no se transfirió ningún origen de replicación bacteriano como resultado de la transformación del algodón con el sistema mediado por *Agrobacterium*.

3.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.

El algodón GHB119 no contiene secuencias del esqueleto del vector pTEM12, lo cual fue demostrado mediante análisis *Southern blot*, para este análisis el DNA genómico aislado de plantas de algodón GHB119 fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRV* o *DraI* y se

¹⁷ Scott, A.; Bushey, D.; Freyssinet, M.; Poe, M.; Rinehardt, M. 2008. 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. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC, USA.



utilizaron cinco sondas que cubren la secuencia completa del esqueleto del vector pTEM12. El control positivo fue evaluado con la sonda completa del T-DNA (PT026-2).

La ausencia de señales de hibridación con las sondas del esqueleto del vector demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto, mientras que la hibridación del control positivo, asegura que las condiciones experimentales para el análisis *Southern blot* fueron adecuadas para permitir la detección los fragmentos de DNA integrados (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

En la

Figura 45 se presenta un esquema de los fragmentos de restricción y la posición de las sondas utilizadas. Asimismo, en el **Cuadro 31** se presentan los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación.

Figura 45. Esquema del vector pTEM12 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la estrategia de hibridación utilizada.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Cuadro 31. Resumen de los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación, que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón GHB119.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 46. Resultados del análisis *Southern blot* – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón GHB119.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 47. Resultados del análisis *Southern blot* – Ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón GHB119 (continuación).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

3.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.

Fragmento de integración de los bordes derecho e izquierdo.

Los resultados del análisis *Southern blot* demostraron que únicamente una copia completa del T-DNA fue integrada en el algodón GHB119 y que el DNA transferido al algodón corresponde a la misma configuración diseñada en el vector de transformación (pTEM12).

Adicionalmente, se realizaron análisis PCR utilizando DNA genómico del algodón convencional como plantilla y un par de *primers* específicos para las secuencias flanqueantes 5' y 3', lo cual permitió determinar 684 bp correspondientes al *locus* de pre-integración, incluyendo 367 bp de la



secuencia flanqueante 5', 309 bp de la secuencia flanqueante 3' y un sitio de delección de 8 bp. El análisis bio-informático del *locus* de pre-inserción, demostró que el origen de las secuencias flanqueantes caracterizadas es la planta de algodón.

El DNA del *locus* de pre-inserción del algodón GHB119 fue secuenciado y sometido a análisis bio-informático para identificar genes endógenos del algodón o elementos regulatorios que pudieran haber sido influenciados por la inserción del T-DNA. Se detectó homología con el DNA genómico pero no se le pudo atribuir ninguna función biológica a estas secuencias. Asimismo, se detectó homología con secuencias repetitivas, indicando que la inserción del T-DNA tuvo lugar en una región que contenía estos elementos repetitivos.

Para identificar la presencia de genes funcionales conocidos en el *locus* de pre-inserción del evento GHB119, se realizó un análisis de búsqueda de similitud de secuencias BLASTx¹⁸, pero no se detectó ninguna proteína conocida.

1. Utilizando las herramientas de predicción GetORF y FGENESH, no se pudo predecir ningún gen o marco de lectura abierto (ORF), que pudieran haber sido alterados por la introducción del T-DNA en el genoma de la planta de algodón.

2. La secuencia que rodea el *locus* de pre-inserción fue sometida a análisis de homología comparándola con elementos regulatorios involucrados en la transcripción. Se pudieron predecir dos secuencias promotoras, sin embargo, debido a que no se predijeron o encontraron genes endógenos conocidos, es muy poco probable que estos promotores sean biológicamente activos. (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

Búsqueda de similitud de secuencias (BLASTn) y marcos de lectura abiertos.

Se realizó un análisis bio-informático para detectar la posible presencia de alguna expresión críptica debida a la formación de nuevos marcos de lectura abiertos (ORF), creados en las regiones de unión 5' y 3' en el evento GHB119. Estas uniones se formaron por la inserción de la construcción genética *cry2Ae – bar* en el genoma del algodón.

Se utilizaron varias herramientas *in silico* para buscar ORFs y elementos reguladores tomando en consideración el conocimiento científico actual sobre expresión genética. Se identificaron tres nuevos ORF quiméricos, por lo que los nucleótidos adyacentes a estos ORF también fueron sometidos a análisis de homología, comparándolos con elementos reguladores importantes para la transcripción y traducción. A pesar de la identificación de tres ORF quiméricos, la probabilidad de la expresión de nuevas proteínas debida a la inserción del T-DNA que contiene la construcción genética *cry2Ae – bar*, es altamente improbable, ya que no están presentes todos los elementos reguladores en la secuencia de DNA de los extremos 5' y 3'.

¹⁸ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias, ya sea de ADN, ARN o de proteínas.



4. Evento COT102.

El evento COT102 se obtuvo mediante transformación de la variedad de algodón Coker 312 con *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el plásmido pCOT1 (Tinland and Hohn, 1995; Trolinder *et al.*, 1988a, Trolinder *et al.*, 1988b). Este plásmido contiene el gen *vip3Aa19* que confiere resistencia a insectos lepidópteros, así como el gen *aph4* que funciona como marcador de selección.

El número de copias del T-DNA del plásmido pCOT1 insertadas en el genoma del algodón, la integridad de las secuencias codificantes *vip3Aa19* y *aph4*, la integridad de los *cassettes* de expresión de *vip3Aa19* y *aph4*, así como la confirmación de la ausencia del esqueleto del plásmido en el algodón fueron determinados mediante análisis *Southern Blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (*vip3Aa*, *aph4*, promotor actin-2, promotor ubiquitin-3, gen *Spec*, gen RepA, VS1 ori, ColE1 ori) como sondas. Los resultados del análisis indican que el evento COT102 contiene únicamente una copia intacta del T-DNA del plásmido pCOT101, asimismo los resultados confirman la ausencia de cualquier otra secuencia de DNA fuera de los bordes del T-DNA (Artim *et al.*, 2003¹⁹).

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutricional y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

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

1. Proteína 2mEPSPS.

El evento GHB614 produce la proteína 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS) codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz (*Zea mays* L.). El gen *2mepsps* consta de 1338 pb y ha sido modificado a través de mutagénesis sitio-dirigida en la posición 102 (sustituyendo treonina por isoleucina) y en la posición 106 (sustituyendo prolina por serina), para codificar una enzima insensible a la desactivación por glifosato (Lebrun *et al.*, 1997). Estas mutaciones corresponden a las posiciones 103 y 107 de la proteína 2mEPSPS madura. Para restaurar el sitio de escisión del péptido de tránsito se adicionó el codón de la metionina entre el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína 2mEPSPS y el péptido de tránsito (De Beuckeleer, 2003). La proteína 2mEPSPS madura de 47 kDa está constituida por 445 aminoácidos (Figura 48).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 48. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

¹⁹ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.



2. Proteína Cry1Ab.

El evento T304-40 produce la proteína insecticida Cry1Ab de 617 aminoácidos codificada por el gen *cry1Ab* de 1851 pb derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*, esta proteína es efectiva para el control de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*) y gusano tabacalero (*Heliothis virescens*) (Figura 49). **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL.**

Figura 49. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry1Ab codificada por el gen *cry1Ab* de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

3. Proteína Cry2Ae.

El evento GHB119 produce la proteína insecticida Cry2Ae de 631 aminoácidos codificada por el gen *cry2Ae* de 1893 pb derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota*, esta proteína es efectiva para el control de insectos plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL.**

Figura 50. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry2Ae codificada por el gen *cry2Ae* de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

4. Proteína PAT.

El algodón T304-40 también expresa la proteína fosfinothricin acetyl transferase (PAT/*bar*), codificada por el gen *bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygrosopicus*, utilizado como marcador de selección y que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El algodón GHB119 también expresa la proteína fosfinothricin acetyl transferase (PAT/*bar*) de 183 aminoácidos, codificada por el gen *bar* de 552 pb derivado de la bacteria *Streptomyces hygrosopicus*, utilizado como marcador de selección y que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

Figura 51. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína PAT codificada por el gen *bar* de la bacteria *Streptomyces hygrosopicus*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



5. Proteína Vip3Aa19.

El evento **COT102** produce la proteína insecticida Vip3Aa19 de 789 aminoácidos codificada por el gen *vip3Aa19* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Figura 52), esta proteína confiere resistencia al ataque de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusanos falsos medidores (*Pseudoplusia includens/ Trichoplusia ni*) y gusano perforador de la hoja (*Bucculatrix thurberiella*).

Figura 52. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Vip3Aa19 codificada por el gen *vip3Aa19* de la bacteria *Bacillus thuringiensis* cepa AB88.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

6. Proteína APH4.

El algodón COT102 también contiene el marcador de selección hygromycin B phosphotransferase (APH4) de 341 aminoácidos (Figura 53).

Figura 53. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína APH4 codificada por el gen *aph4* de la bacteria *Escherichia coli*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.



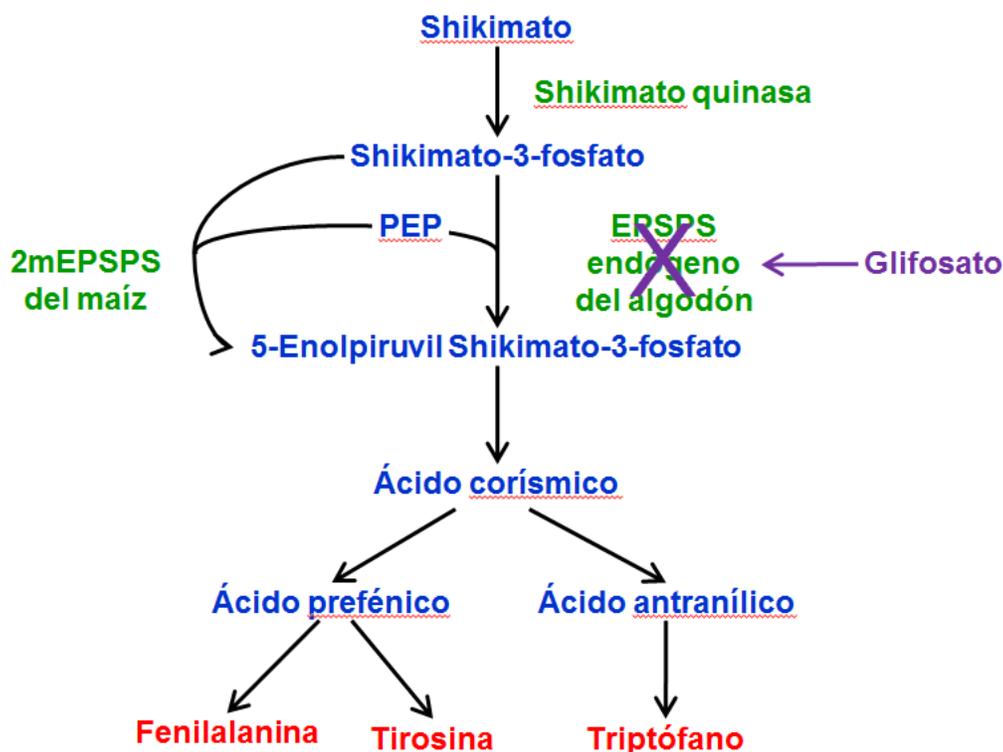
n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios.

1. Proteína 2mEPSPS.

El evento GHB614 produce la proteína 5-enolpiruvilshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS) codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz (*Zea mays* L.) (Herouet-Guicheney *et al.*, 2009). El gen *2mepsps* consta de 1338 pb y ha sido modificado a través de mutagénesis sitio-dirigida para codificar una enzima insensible a la desactivación por glifosato (Lebrun *et al.*, 1997). Para restaurar el sitio de escisión del péptido de tránsito se adicionó el aminoácido metionina en N-terminal de la secuencia de la proteína 2mEPSPS (De Beuckeleer, 2003), la cual está constituida por 445 aminoácidos y un peso molecular de ~47.5 kDa. La expresión de la proteína 2mEPSPS confiere tolerancia a las plantas de algodón al herbicida glifosato.

El mecanismo de acción del glifosato consiste en la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvil-shikimate-3-fosfato sintasa (EPSPS) en la ruta metabólica del shikimate (Sikorski & Gruys, 1997). La inhibición de la enzima EPSPS por el glifosato bloquea esta ruta metabólica, lo cual eventualmente provoca la muerte de la célula (Steinrucken & Amrhein, 1980). La enzima EPSPS cataliza la transferencia reversible del grupo enolpiruvil desde el fosfenol piruvato (PEP) (PEP) al 5-hidroxil de shikimate-3-fosfato (S3P) resultando en la producción de fosfato inorgánico y 5-enolpiruvil shikimate-3-fosfato (EPSP) (Alibhai & Stallings, 2001), sitio de inhibición por el glifosato. Este es el único producto metabólico conocido y 5-enolpiruvil shikimate-3-fosfato es el penúltimo producto de la vía del ácido shikímico. El ácido shikímico es un sustrato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) como también de varios metabolitos secundarios, como el tetrahidrofolato, la ubiquinona y la vitamina K. Es importante destacar que la vía del shikimate y, por lo tanto, las proteínas EPSPS no están presentes en mamíferos, peces, aves, reptiles e insectos (Bentley, 1990; Alibhai & Stallings, 2001; Eschenburg *et al.*, 2002). En contraste, se ha calculado que las moléculas aromáticas, todas derivadas del ácido shikímico, representan el 35% o más del peso seco de una planta (Franz *et al.* 1997). La unión del sustrato a la enzima es secuencial, iniciando con la unión del S3P y posteriormente el PEP (Boocock and Coggins, 1983). La reacción catalizada por la enzima EPSPS inicia con el rompimiento del enlace C-O del PEP (Walsh *et al.*, 1996) (Figura 54).

Figura 54. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS.



La inhibición de la actividad enzimática de EPSPS ocurre debido a la formación de un complejo ternario de EPSPS-S3P-glifosato. La unión de glifosato bloquea de manera eficaz la unión de PEP y evita la catálisis EPSPS de S3P y PEP. Sin embargo, en presencia de 2mEPSPS, la afinidad por PEP es mucho mayor que la afinidad por el glifosato, entonces 2mEPSPS se une preferentemente al PEP incluso en presencia del glifosato y la catálisis continúa del mismo modo en que lo hace frente a la ausencia de glifosato. Esta diferencia en la afinidad de unión del glifosato es la base para la tolerancia al glifosato en plantas transformadas con 2mEPSPS. La enzima 2mEPSPS continúa funcionando en presencia del glifosato y produce los aminoácidos aromáticos y demás metabolitos necesarios para el crecimiento y el desarrollo normal de la planta.

La familia de proteínas EPSPS está ampliamente distribuida en la naturaleza en plantas, hongos y microorganismos. En las plantas, la enzima EPSPS es codificada por un gen nuclear y sintetizada como una pre-proteína (unida al péptido de tránsito) por ribosomas libres en el citoplasma celular; el péptido de tránsito permite el transporte a los cloroplastos. La pre-proteína es transportada al interior del estroma del cloroplasto y es procesada proteolíticamente para producir la enzima madura (Kishore and Shah, 1988; Forlani *et al.*, 1994; Lebrun *et al.*, 1997). Una vez desprendido, el péptido de transferencia al cloroplasto se degrada rápidamente (Bartlett *et al.*, 1982; Della-Cioppa *et al.*, 1986).

Desde la década de 1980 se han realizado varios intentos para identificar y caracterizar enzimas EPSPS insensibles a glifosato a partir de varios organismos, con el objetivo de obtener plantas genéticamente modificadas tolerantes a este herbicida (Kishore and Shah, 1988). Lebrun *et al.* (1997) seleccionaron un gen con doble mutación a partir del maíz, el cual unido a un péptido de tránsito quimérico optimizado ha permitido obtener una óptima tolerancia a glifosato en varios cultivos, sin efecto pleiotropicos: el gen *2mepsps* codificando la proteína 2mEPSPS. El gen *2mepsps* ha sido introducido como fuente de tolerancia a glifosato en maíz evento GA21, el cual ha



sido aprobado por diferentes agencias para liberación al ambiente y consumo alrededor del mundo. Otro cultivo en el cual se ha logrado la tolerancia a glifosato a partir de mutagénesis del gen *epsps* es el arroz (Zhou *et al.*, 2006).

2. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *Bacillus thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de pro-toxinas. Estas no producirán el daño *per se*, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que producirán el efecto tóxico.

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, parálisis total y finalmente la muerte (Aronson *et al.*, 1986). Los estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y en particular, la microvellosidad apical, la cual se destruye en su totalidad (Ebersold *et al.*, 1978). Los efectos en el otro tipo de células de las que está constituido el intestino medio de los lepidópteros, las células caliciformes, son más lentos, pero en este caso también se ha observado citólisis (Bravo *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1985).

2.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.

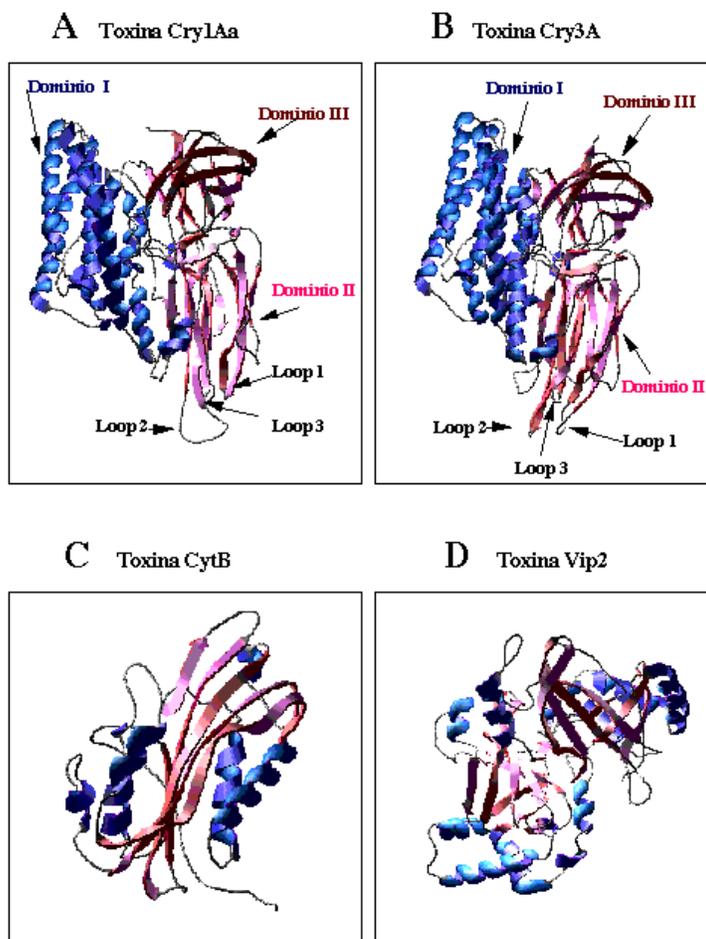
Los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino liberando a la pro-toxina (Gringorten *et al.*, 1992), también se requiere un medio ambiente reductor para romper los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad C-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa. El intestino medio de la mayor parte de las larvas de insectos susceptibles (lepidópteros, dípteros y algunos grupos de coleópteros) se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras.

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico. Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros 28 residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado (Bravo *et al.*, 1992) y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, quedando de esta forma un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que se le denomina toxina. La posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal no es constante sino que se localiza en la región 609 a 630.

La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry (Grochulski *et al.*, 1995), ha revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios. El dominio I está constituido por un ramillete de siete α -hélices anfipáticas donde seis de ellas rodean a la α -hélice 5. El dominio II está formado por tres láminas β -antiparalelas que terminan en asas (*loops* 1, 2 y 3) en el vértice de la molécula formando un prisma. El dominio III está compuesto de dos hojas β -plegadas arregladas en forma de emparedado una sobre otra (Figura 18).

Todas las toxinas Cry presentan cinco bloques conservados en su secuencia de aminoácidos que se localizan en las regiones centrales y de contacto entre los dominios. La localización estratégica de estas regiones permite inferir que los miembros de la familia Cry que las contengan podrían tener un pliegamiento similar y por lo tanto un mecanismo de acción semejante.

Figura 55. Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis*.



Fuente: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap12/capitulo.html>

2.2. Unión al receptor.

Después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros, coleópteros y dípteros. La unión a estos sitios es muy específica y es una etapa determinante en la toxicidad. Los estudios de competencia homóloga han mostrado que la cinética de unión de las toxinas Cry a las vesículas de la membrana de borde en cepillo de los insectos susceptibles es bifásica, compuesto de un paso reversible y otro irreversible. La interacción inicial entre la toxina y su sitio de unión (unión reversible) es un requisito para la toxicidad pero no es suficiente. Los eventos posteriores tales como la unión irreversible y la inserción en la membrana parecen estar más correlacionados con la toxicidad.

Las regiones de la toxina que participan en la interacción con el receptor se localizan en los dominios II y III. Estas regiones se han identificado por medio de análisis de mutantes sitio-dirigidas. Se ha determinado que las cuatro regiones prominentes en esta interacción en el dominio II son: el *loop* de la α -hélice 8 y las *loops* 1 (entre $\beta 2$ y $\beta 3$), 2 (entre $\beta 6$ y $\beta 7$) y 3 (entre $\beta 10$ y $\beta 11$).



La función de cada una de estas regiones puede ser diferente en los distintos insectos susceptibles (<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>).

2.3. Inserción en la membrana y formación de poro.

La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana, formando poros con un diámetro de 1 a 2 nm. El tamaño de estos poros y la aparición frecuente de múltiples estados de conductancia en los estudios de la actividad de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas se han considerado como evidencias de la formación de diversos estados de agregación de las δ -endotoxinas. Se propone que se requieren cuatro toxinas Cry para formar un poro en donde las hélices 4 y 5 se encuentran insertadas en la membrana (<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>).

2.4. Citólisis.

Se ha propuesto que las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica. Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso al hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia.

2.5. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

El evento **T304-40** produce la proteína insecticida Cry1Ab de 617 aminoácidos y un peso molecular de 69 kDa, codificada por el gen *cry1Ab* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* (Bt), esta proteína es efectiva para el control de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*) y gusano tabacalero (*Heliothis virescens*).

El evento **GHB119** produce la proteína insecticida Cry2Ae de 631 aminoácidos y un peso molecular de 71 kDa, codificada por el gen *cry2Ae* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* (Bt), esta proteína es efectiva para el control de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*).

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



Las proteínas Cry1 se producen en forma de protoxinas de 130-140 kDa en tamaño, con 1100-1200 residuos de aminoácidos (Aronson and Shai 2001; Kumar *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2007; OECD, 2007). En el caso de la Cry1A, las protoxinas se dividen para generar toxinas activas que están compuestas por fragmentos de 60-70 kDa de la porción terminal N de la proteína (Knowles, 1994; Kumar *et al.*, 1996; OECD, 2007). El mecanismo de acción insecticida es un proceso complejo en el cual las toxinas activas se adhieren a receptores específicos en la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino medio de los insectos susceptibles (Aronson and Shai, 2001; Kumar *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2011; OECD, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Una vez unida a los receptores, la toxina puede insertarse en la membrana plasmática mediante la formación de poros oligoméricos transmembrana (Aronson and Shai 2001, Bravo *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 1996; OECD 2007). Dichos poros forman canales iónicos que afectan el potencial transmembrana, lo cual causa lisis osmótica (Aronson and Shai 2001; Bravo *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2011; Hofte and Whiteley, 1989; Kumar *et al.*, 1996; OECD, 2007).

Para que las proteínas Cry puedan ejercer actividad insecticida tienen que ser ingeridas por los insectos. La proteína en su forma cristalina es insoluble en solución acuosa a pH neutro o ácido (Bulla *et al.*, 1977), sin embargo, el pH del tracto digestivo de las larvas de los insectos es alcalino (pH 8 - 10) y probablemente reductivo, lo que favorece la solubilización del cristal (Tojo and Aizawa, 1983; Ogiwara *et al.*, 1992). Una vez ingerida, la proteína es subsecuentemente activada por proteasas en el tracto digestivo del insecto. Estas proteasas cortan el extremo carboxilo terminal del resto de la proteína (Chroma y Kaplan, 1990), al igual que aproximadamente 28 aminoácidos del extremo amino terminal. La proteína activada, que consiste de aproximadamente 660 aminoácidos, se difunde a través de la membrana peritrófica del insecto al epitelio del mesenterón. Aquí se une a receptores específicos de alta afinidad (Wolfersberger *et al.*, 1986, Hofmann *et al.*, 1988, Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990). Se forman poros en la membrana que causa derramamiento de los contenidos celulares (i. e. K+) en el lumen del intestino y agua hacia las células epiteliales de intestino (Sacchi *et al.*, 1986; Knowles *et al.*, 1989). Las células epiteliales del tracto de las larvas se hinchan debido a la presión osmótica y se lisan. El tracto se paraliza como consecuencia de los cambios en electrolitos y pH lo que provoca que la larva deje de comer y muera.

El requerimiento de un pH alcalino y proteasas específicas del intestino de las larvas de insectos es una característica importante de la actividad insecticida específica de *Bacillus thuringiensis*, debido a que los mamíferos y otros insectos no blanco no pueden solubilizar los cristales de Bt, estos pasan a través del sistema digestivo de los organismos no blanco en su forma inalterada y por lo tanto no tóxica.

3. Proteína PAT/*bar*.

El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 contiene el cassette de expresión *bar* que, cuando se transcribe, origina la proteína PAT de ~21 kDa que consiste de un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La secuencia del gen *bar* proviene de *Streptomyces hygroscopicus* y codifica la proteína fosfotricina N-acetil transferasa (PAT) (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confiere tolerancia a glufosinato de amonio.

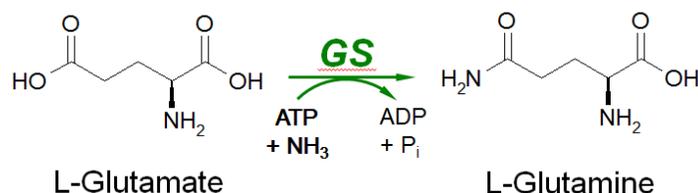
El herbicida glufosinato es una mezcla racémica de formas D y L de fosfotricina, aunque sólo la forma L (L-fosfotricina) tiene actividad herbicida. Este herbicida es un potente inhibidor de la enzima glutamino sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une

competitivamente a la enzima GS desplazando al L-glutamato del sitio activo (OECD, 1999; OECD, 2002a) (Figura 56).

La enzima glutamino sintetasa (GS) es esencial en el metabolismo de nitrógeno en plantas superiores, donde es la única enzima en plantas que puede detoxificar el amoníaco liberado por la reducción de nitrato, degradación de aminoácidos y fotorespiración. El amoníaco, aun siendo un nutriente vegetal es tóxico si se encuentra en exceso y lleva a la muerte de la célula vegetal (OECD, 1999; OECD, 2002a).

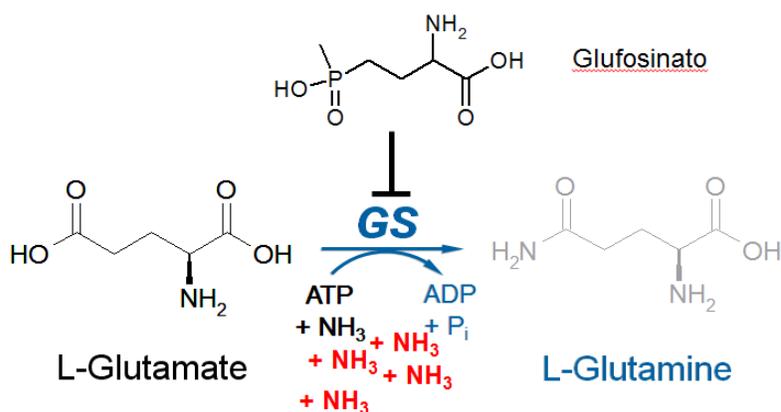
Figura 56. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.

a) Asimilación del amoníaco.



GS: Glutamine synthase

b) Inhibición de la enzima GS.

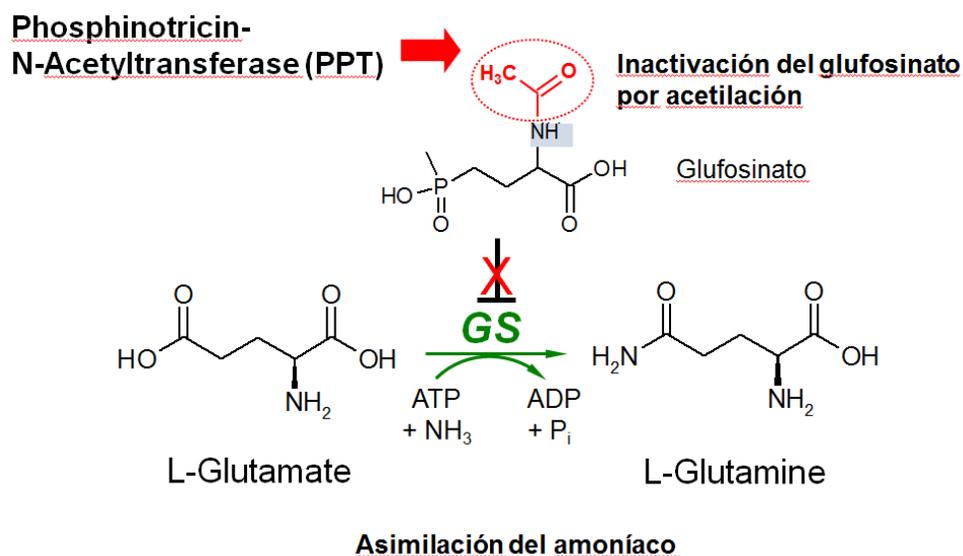


Acumulación de iones de amoníaco
 +NH₃ y disminución de L-Glutamina

La enzima PAT es una acetiltransferasa que cataliza específicamente la acetilación de L-fosfotricin (L-PPT) y demetilfosfotricin (DMPT) (Thompson *et al.*, 1987). L-PPT y DMPT son inhibidores de la enzima glutamino sintasa (GS). Esta inhibición resulta en la acumulación de iones de amoníaco tóxicos y una disminución de la cantidad de glutamina, un aminoácido esencial utilizado en muchos procesos anabólicos. El glufosinato de amonio es la sal de amonio de L-PPT. Solamente el L-isómero es un inhibidor de la glutamino sintetasa. La enzima PAT

expresada por el gen *pat* tiene la capacidad de conferir tolerancia al glufosinato de amonio a las plantas modificadas con este gen. La tolerancia al herbicida es una consecuencia de la acetilación y resultante desactivación de L-PPT en el herbicida glufosinato de amonio.

Figura 57. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.



La actividad enzimática de la proteína PAT sigue las cinéticas simples Michaelis-Menten (Wehrmann *et al.*, 1996). En presencia de acetyl-CoA como co-sustrato, la proteína PAT cataliza la acetilación del grupo amino libre de L-Fosfinotricin (L-PPT) a N-acetil glufosinato (N-acetyl-L-PPT), un compuesto que no inactiva la glutamina sintetasa y no tiene actividad herbicida.

La enzima PAT es altamente específica para L-PPT. No acetila a otros L-aminoácidos, incluido el glutamato, que es estructuralmente el más parecido al L-glufosinato, ni al acetilato D-PPT. Un exceso de concentración de L-aminoácidos no afecta a la proteína PAT en su capacidad de acetilar L-PPT.

4. Proteína Vip3Aa19.

El evento COT102 codifica la toxina Vip3Aa19 de 780 aminoácidos, la cual pertenece al grupo de proteínas insecticidas vegetativas (Vip) producidas por *Bacillus thuringiensis*. Las proteínas Vip son producidas principalmente durante el crecimiento vegetativo de las bacterias y secretadas como proteínas solubles en el ambiente extracelular. Las proteínas Vip también continúan siendo producidas durante la fase estacionaria de crecimiento y esporulación. Por esto, las proteínas Vip se encuentran presentes en los distintos bioinsecticidas comerciales formulados en base a *Bacillus thuringiensis*, teniendo por lo tanto las proteínas Vip un historial de uso seguro. El mecanismo de acción de esta proteína también asegura la no toxicidad para otros organismos que no sean insectos. Esta proteína requiere unirse a un receptor específico para que actúe como toxina y éste se encuentra sólo en algunas especies de insectos lepidópteros.



Al igual que las proteínas Cry, la proteína Vip3Aa19 de 89 kDa es activada proteolíticamente por la tripsina y los jugos gástricos produciendo un núcleo activo de 60 kDa en el intestino medio de insectos lepidópteros. Una vez que la proteína Vip3Aa19 se encuentra en la forma activa, se une a la membrana vesicular de la mucosa del intestino medio de los insectos lepidópteros susceptibles. El sitio de unión de Vip3Aa19 no es el mismo sitio en donde se une Cry1A, y la unión al intestino se correlaciona con la toxicidad (Lee *et al.*, 2003; Sena *et al.*, 2009; Abdelkefi-Mesrati *et al.*, 2009). Después de la unión, Vip3Aa19 provoca la parálisis del intestino, seguida por la lisis de las células epiteliales del intestino, probablemente debido a la interferencia del potencial transmembrana, lo que resulta en la muerte de células. La proteína activada puede formar poros transmembrana y se considera que estos poros contribuyen a la lisis y a la muerte de las células epiteliales del intestino medio (Lee *et al.*, 2003). Los síntomas de toxicidad de Vip3Aa se desarrollan con más lentitud que con Cry1A (de 48 a 72 horas, en comparación con 16 a 24 horas), pero se puede comparar la toxicidad de Vip3Aa con la de Cry1 por unidad de peso (Yu *et al.* 1997; Ali & Luttrell, 2011).

En adición a su actividad insecticida, no se conoce que las proteínas Vip tengan alguna otra actividad biológica o función catalítica. A pesar de la falta de homología con las proteínas Cry, se ha demostrado que las proteínas Vip también son altamente específicas y efectivas para el control de ciertas especies de insectos lepidópteros como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda* y *S. exigua* (van Frankenhuyzen and Nystrom, 2002), lo cual, aunado a sus propiedades diferentes de unión a receptor y formación de poro, representa una excelente herramienta para la prevención o manejo de resistencia de los insectos a las proteínas Cry.

El evento **COT102 (SYN-IR1Ø2-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

5. Proteína APH4.

La enzima hygromicina-B fosforotransferasa (APH4) codificada por el gen *aph4* de la bacteria *Escherichia coli*, funciona como marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico higromicina, este gen está ampliamente distribuido en la naturaleza y que confiere resistencia a un antibiótico que no tiene relevancia en medicina humana y tan sólo se le da un uso restringido en medicina veterinaria.

El evento **COT102 (SYN-IR1Ø2-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.



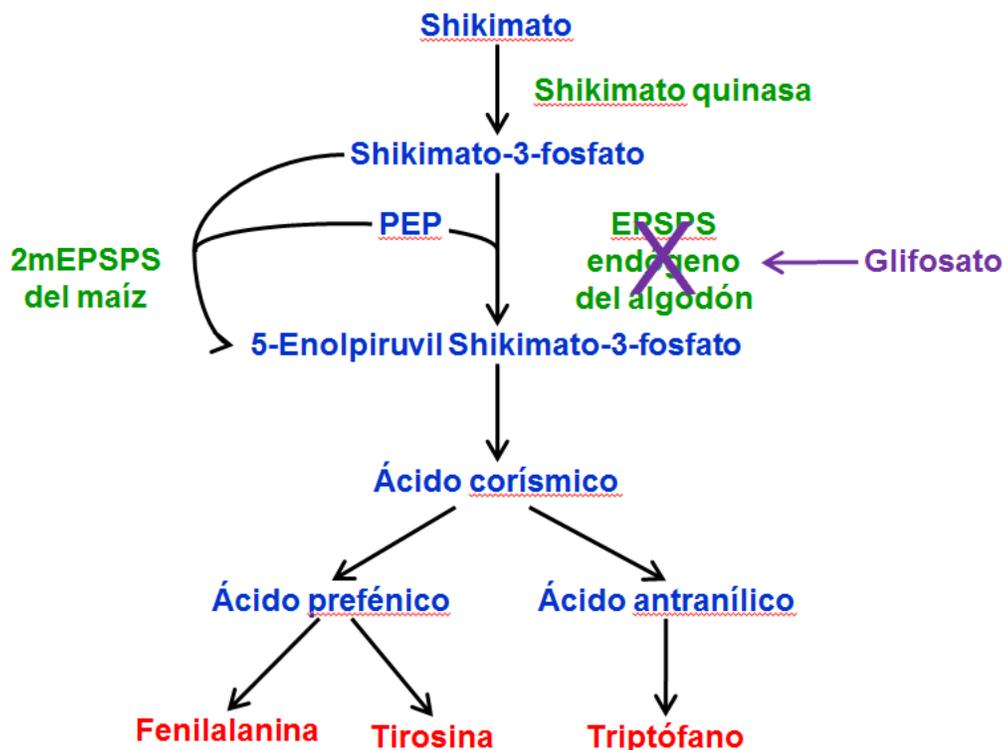
o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos.

1. Proteína 2mEPSPS.

El evento GHB614 produce la proteína 5-enolpiruvilshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS) codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz (*Zea mays* L.) (Herouet-Guichenev *et al.*, 2009). El gen *2mepsps* consta de 1338 pb y ha sido modificado a través de mutagénesis sitio-dirigida para codificar una enzima insensible a la desactivación por glifosato (Lebrun *et al.*, 1997). Para restaurar el sitio de escisión del péptido de tránsito se adicionó el aminoácido metionina en N-terminal de la secuencia de la proteína 2mEPSPS (De Beuckeleer, 2003), la cual está constituida por 445 aminoácidos y un peso molecular de ~47.5 kDa. La expresión de la proteína 2mEPSPS confiere tolerancia a las plantas de algodón al herbicida glifosato.

El mecanismo de acción del glifosato consiste en la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvil-shikimate-3-fosfato sintasa (EPSPS) en la ruta metabólica del shikimate (Sikorski & Gruys, 1997). La inhibición de la enzima EPSPS por el glifosato bloquea esta ruta metabólica, lo cual eventualmente provoca la muerte de la célula (Steinrucken & Amrhein, 1980). La enzima EPSPS cataliza la transferencia reversible del grupo enolpiruvil desde el fosfenol piruvato (PEP) (PEP) al 5-hidroxil de shikimate-3-fosfato (S3P) resultando en la formación de fosfato inorgánico y 5-enolpiruvil shikimate-3-fosfato (EPSP) (Alibhai y Stallings, 2001), sitio de inhibición por el glifosato. Este es el único producto metabólico conocido y 5-enolpiruvil shikimate-3-fosfato es el penúltimo producto de la vía del ácido shikímico. El ácido shikímico es un sustrato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) como también de varios metabolitos secundarios, como el tetrahidrofolato, la ubiquinona y la vitamina K. Es importante destacar que la vía del shikimate y, por lo tanto, las proteínas EPSPS no están presentes en mamíferos, peces, aves, reptiles e insectos (Bentley, 1990; Alibhai & Stallings, 2001; Eschenburg *et al.*, 2002). En contraste, se ha calculado que las moléculas aromáticas, todas derivadas del ácido shikímico, representan el 35% o más del peso seco de una planta (Franz *et al.* 1997). La unión del sustrato a la enzima es secuencial, iniciando con la unión del S3P y posteriormente el PEP (Boocock and Coggins, 1983). La reacción catalizada por la enzima EPSPS inicia con el rompimiento del enlace C-O del PEP (Walsh *et al.*, 1996) (Figura 58).

Figura 58. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS.



La inhibición de la actividad enzimática de EPSPS ocurre debido a la formación de un complejo ternario de EPSPS-S3P-glifosato. La unión de glifosato bloquea de manera eficaz la unión de PEP y evita la catálisis EPSPS de S3P y PEP. Sin embargo, en presencia de 2mEPSPS, la afinidad por PEP es mucho mayor que la afinidad por el glifosato, entonces 2mEPSPS se une preferentemente al PEP incluso en presencia del glifosato y la catálisis continúa del mismo modo en que lo hace frente a la ausencia de glifosato. Esta diferencia en la afinidad de unión del glifosato es la base para la tolerancia al glifosato en plantas transformadas con 2mEPSPS. La enzima 2mEPSPS continúa funcionando en presencia del glifosato y produce los aminoácidos aromáticos y demás metabolitos necesarios para el crecimiento y el desarrollo normal de la planta.

La familia de proteínas EPSPS está ampliamente distribuida en la naturaleza en plantas, hongos y microorganismos. En las plantas, la enzima EPSPS es codificada por un gen nuclear y sintetizada como una pre-proteína (unida al péptido de tránsito) por ribosomas libres en el citoplasma celular; el péptido de tránsito permite el transporte a los cloroplastos. La pre-proteína es transportada al interior del estroma del cloroplasto y es procesada proteolíticamente para producir la enzima madura (Kishore and Shah, 1988; Forlani *et al.*, 1994; Lebrun *et al.*, 1997). Una vez desprendido, el péptido de transferencia al cloroplasto se degrada rápidamente (Bartlett *et al.*, 1982; Della-Cioppa *et al.*, 1986).

Desde la década de 1980 se han realizado varios intentos para identificar y caracterizar enzimas EPSPS insensibles a glifosato a partir de varios organismos, con el objetivo de obtener plantas genéticamente modificadas tolerantes a este herbicida (Kishore and Shah, 1988). Lebrun *et al.* (1997) seleccionaron un gen con doble mutación a partir del maíz, el cual unido a un péptido de tránsito quimérico optimizado ha permitido obtener una óptima tolerancia a glifosato en varios cultivos, sin efecto pleiotropicos: el gen *2mepsps* codificando la proteína 2mEPSPS. El gen *2mepsps* ha sido introducido como fuente de tolerancia a glifosato en maíz evento GA21, el cual ha



sido aprobado por diferentes agencias para liberación al ambiente y consumo alrededor del mundo. Otro cultivo en el cual se ha logrado la tolerancia a glifosato a partir de mutagénesis del gen *epsps* es el arroz (Zhou *et al.*, 2006).

2. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *Bacillus thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de pro-toxinas. Estas no producirán el daño *per se*, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que producirán el efecto tóxico.

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, parálisis total y finalmente la muerte (Aronson *et al.*, 1986). Los estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y en particular, la microvellosidad apical, la cual se destruye en su totalidad (Ebersold *et al.*, 1978). Los efectos en el otro tipo de células de las que está constituido el intestino medio de los lepidópteros, las células caliciformes, son más lentos, pero en este caso también se ha observado citólisis (Bravo *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1985).

2.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.

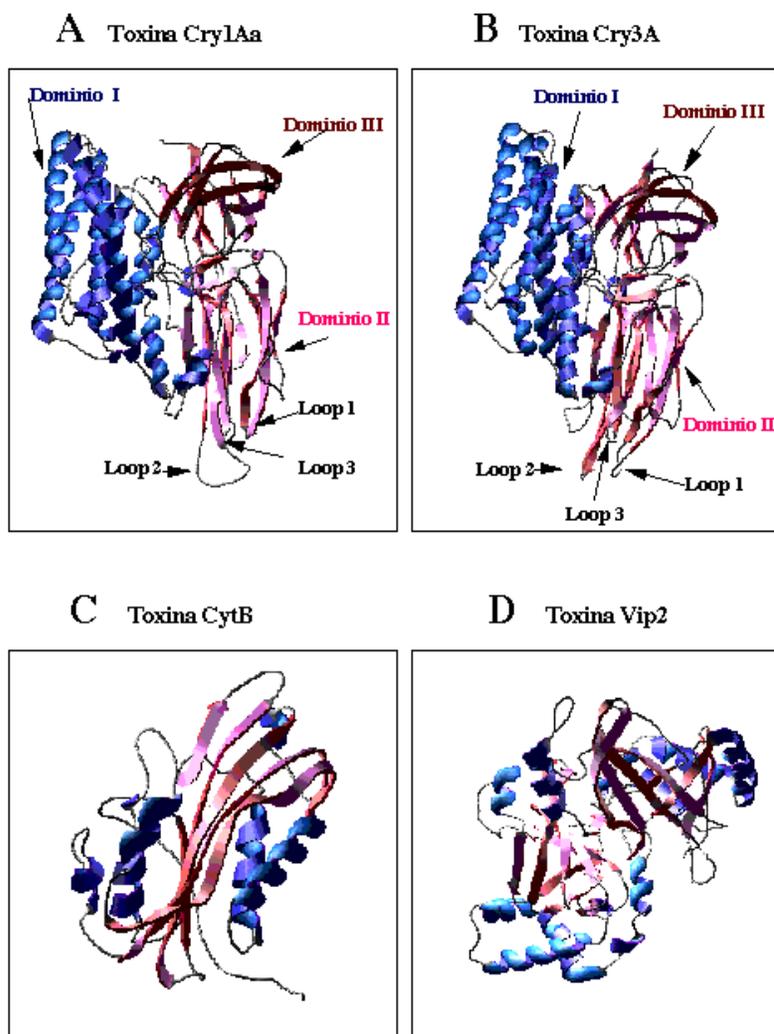
Los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino liberando a la pro-toxina (Gringorten *et al.*, 1992), también se requiere un medio ambiente reductor para romper los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad C-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa. El intestino medio de la mayor parte de las larvas de insectos susceptibles (lepidópteros, dípteros y algunos grupos de coleópteros) se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras.

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico. Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros 28 residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado (Bravo *et al.*, 1992) y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, quedando de esta forma un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que se le denomina toxina. La posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal no es constante sino que se localiza en la región 609 a 630.

La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry (Grochulski *et al.*, 1995), ha revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios. El dominio I está constituido por un ramillete de siete α -hélices anfipáticas donde seis de ellas rodean a la α -hélice 5. El dominio II está formado por tres láminas β -antiparalelas que terminan en asas (*loops* 1, 2 y 3) en el vértice de la molécula formando un prisma. El dominio III está compuesto de dos hojas β -plegadas arregladas en forma de emparedado una sobre otra (Figura 59).

Todas las toxinas Cry presentan cinco bloques conservados en su secuencia de aminoácidos que se localizan en las regiones centrales y de contacto entre los dominios. La localización estratégica de estas regiones permite inferir que los miembros de la familia Cry que las contengan podrían tener un plegamiento similar y por lo tanto un mecanismo de acción semejante.

Figura 59. Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis*.



Fuente: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap12/capitulo.html>

2.2. Unión al receptor.

Después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros, coleópteros y dípteros. La unión a estos sitios es muy específica y es una etapa determinante en la toxicidad. Los estudios de competencia homóloga han mostrado que la cinética de unión de las toxinas Cry a las vesículas de la membrana de borde en cepillo de los insectos susceptibles es bifásica, compuesto de un paso reversible y otro irreversible. La interacción inicial entre la toxina y su sitio de unión (unión reversible) es un requisito para la toxicidad pero no es suficiente. Los eventos posteriores tales como la unión irreversible y la inserción en la membrana parecen estar más correlacionados con la toxicidad.



Las regiones de la toxina que participan en la interacción con el receptor se localizan en los dominios II y III. Estas regiones se han identificado por medio de análisis de mutantes sitio-dirigidas. Se ha determinado que las cuatro regiones prominentes en esta interacción en el dominio II son: el loop de la α -hélice 8 y las loops 1 (entre $\beta 2$ y $\beta 3$), 2 (entre $\beta 6$ y $\beta 7$) y 3 (entre $\beta 10$ y $\beta 11$). La función de cada una de estas regiones puede ser diferente en los distintos insectos susceptibles (<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>).

2.3. Inserción en la membrana y formación de poro.

La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana, formando poros con un diámetro de 1 a 2 nm. El tamaño de estos poros y la aparición frecuente de múltiples estados de conductancia en los estudios de la actividad de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas se han considerado como evidencias de la formación de diversos estados de agregación de las δ -endotoxinas. Se propone que se requieren cuatro toxinas Cry para formar un poro en donde las hélices 4 y 5 se encuentran insertadas en la membrana (<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>).

2.4. Citólisis.

Se ha propuesto que las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica. Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso al hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia.

2.5. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

El evento **T304-40** produce la proteína insecticida Cry1Ab de 617 aminoácidos y un peso molecular de 69 kDa, codificada por el gen *cry1Ab* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* (Bt), esta proteína es efectiva para el control de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*) y gusano tabacalero (*Heliothis virescens*).

El evento **GHB119** produce la proteína insecticida Cry2Ae de 631 aminoácidos y un peso molecular de 71 kDa, codificada por el gen *cry2Ae* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* (Bt), esta proteína es efectiva para el control de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*).

El efecto tóxico de las proteínas Bt requiere de condiciones alcalinas (como las proporcionadas en el intestino de la larva del insecto) para que se disuelvan los cristales, digestión parcial por proteasas específicas para que liberen el núcleo activo de la toxina y la unión específica de ésta a receptores presentes en la superficie de las células epiteliales del intestino medio del insecto. La



unión específica de la toxina a estos receptores conduce a la formación de poros en la membrana plasmática y a la eventual muerte celular, parálisis intestinal e inanición. Estos son los pasos que proporcionan el alto grado de especificidad para cada proteína Bt (English & Slatin 1992; Hofmann *et al.*, 1988; Knowles & Dow, 1993; Van Rie *et al.*, 1989).

Las proteínas Cry1 se producen en forma de protoxinas de 130-140 kDa en tamaño, con 1100-1200 residuos de aminoácidos (Aronson and Shai 2001; Kumar *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2007; OECD, 2007). En el caso de la Cry1A, las protoxinas se dividen para generar toxinas activas que están compuestas por fragmentos de 60-70 kDa de la porción terminal N de la proteína (Knowles, 1994; Kumar *et al.*, 1996; OECD, 2007). El mecanismo de acción insecticida es un proceso complejo en el cual las toxinas activas se adhieren a receptores específicos en la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino medio de los insectos susceptibles (Aronson and Shai, 2001; Kumar *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2011; OECD, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Una vez unida a los receptores, la toxina puede insertarse en la membrana plasmática mediante la formación de poros oligoméricos transmembrana (Aronson and Shai 2001, Bravo *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 1996; OECD 2007). Dichos poros forman canales iónicos que afectan el potencial transmembrana, lo cual causa lisis osmótica (Aronson and Shai 2001; Bravo *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2011; Hofte and Whiteley, 1989; Kumar *et al.*, 1996; OECD, 2007).

Para que las proteínas Cry puedan ejercer actividad insecticida tienen que ser ingeridas por los insectos. La proteína en su forma cristalina es insoluble en solución acuosa a pH neutro o ácido (Bulla *et al.*, 1977), sin embargo, el pH del tracto digestivo de las larvas de los insectos es alcalino (pH 8 - 10) y probablemente reductivo, lo que favorece la solubilización del cristal (Tojo and Aizawa, 1983; Ogiwara *et al.*, 1992). Una vez ingerida, la proteína es subsecuentemente activada por proteasas en el tracto digestivo del insecto. Estas proteasas cortan el extremo carboxilo terminal del resto de la proteína (Chroma y Kaplan, 1990), al igual que aproximadamente 28 aminoácidos del extremo amino terminal. La proteína activada, que consiste de aproximadamente 660 aminoácidos, se difunde a través de la membrana peritrófica del insecto al epitelio del mesenterón. Aquí se une a receptores específicos de alta afinidad (Wolfersberger *et al.*, 1986, Hofmann *et al.*, 1988, Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990). Se forman poros en la membrana que causa derramamiento de los contenidos celulares (i. e. K+) en el lumen del intestino y agua hacia las células epiteliales de intestino (Sacchi *et al.*, 1986; Knowles *et al.*, 1989). Las células epiteliales del tracto de las larvas se hinchan debido a la presión osmótica y se lisan. El tracto se paraliza como consecuencia de los cambios en electrolitos y pH lo que provoca que la larva deje de comer y muera.

El requerimiento de un pH alcalino y proteasas específicas del intestino de las larvas de insectos es una característica importante de la actividad insecticida específica de *Bacillus thuringiensis*, debido a que los mamíferos y otros insectos no blanco no pueden solubilizar los cristales de Bt, estos pasan a través del sistema digestivo de los organismos no blanco en su forma inalterada y por lo tanto no tóxica.

3. Proteína PAT/*bar*.

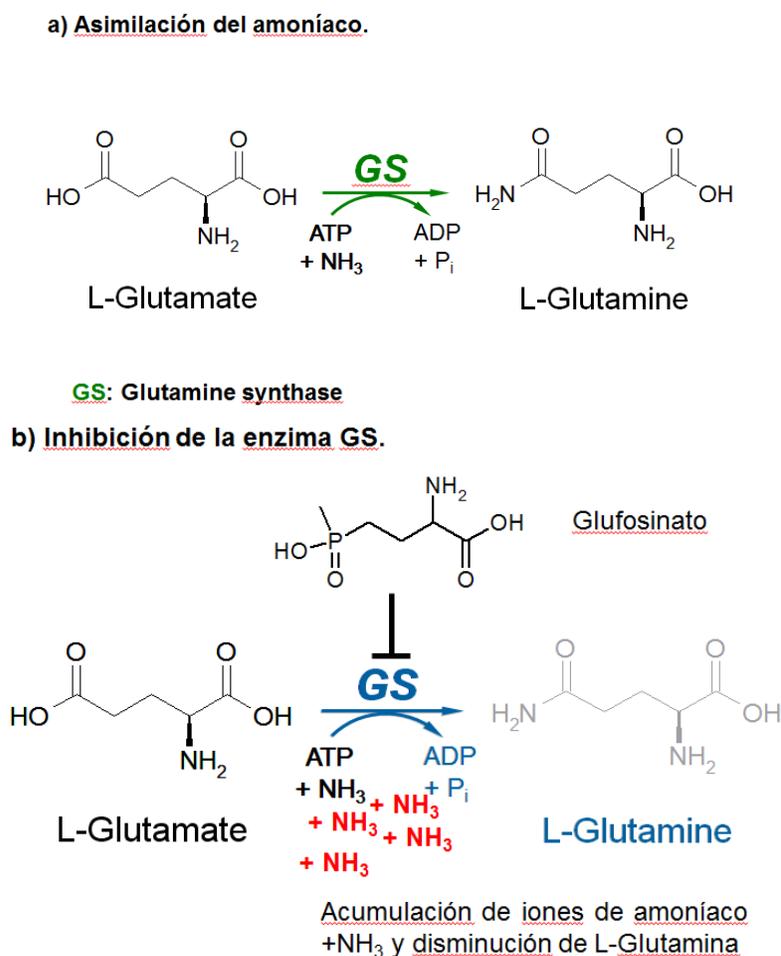
El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 contiene el cassette de expresión *bar* que, cuando se transcribe, origina la proteína PAT de ~21 kDa que consiste de un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La secuencia del gen *bar* proviene de *Streptomyces hygroscopicus* y codifica la proteína fosfinotricina N-acetil transferasa (PAT) (Thompson *et al.*,

1987). La presencia de la proteína PAT en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confiere tolerancia a glufosinato de amonio.

El herbicida glufosinato es una mezcla racémica de formas D y L de fosfotricina, aunque sólo la forma L (L-fosfotricina) tiene actividad herbicida. Este herbicida es un potente inhibidor de la enzima glutamino sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une competitivamente a la enzima GS desplazando al L-glutamato del sitio activo (OECD, 1999; OECD, 2002a) (Figura 60).

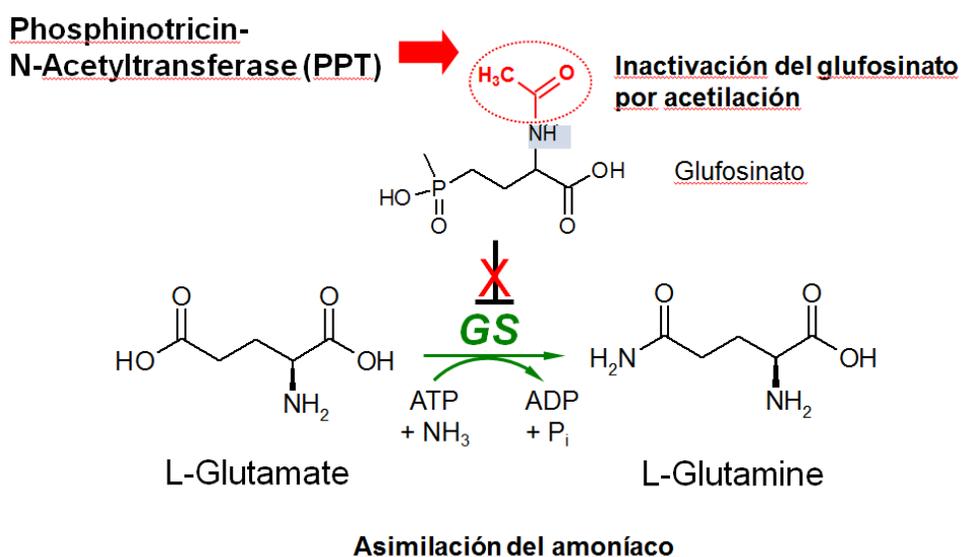
La enzima glutamino sintetasa (GS) es esencial en el metabolismo de nitrógeno en plantas superiores, donde es la única enzima en plantas que puede detoxificar el amoníaco liberado por la reducción de nitrato, degradación de aminoácidos y fotorespiración. El amoníaco, aun siendo un nutriente vegetal es tóxico si se encuentra en exceso y lleva a la muerte de la célula vegetal (OECD, 1999; OECD, 2002a).

Figura 60. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.



La enzima PAT es una acetiltransferasa que cataliza específicamente la acetilación de L-fosfotricin (L-PPT) y demetilfosfotricin (DMPT) (Thompson *et al.*, 1987). L-PPT y DMPT son inhibidores de la enzima glutamino sintasa (GS). Esta inhibición resulta en la acumulación de iones de amoníaco tóxicos y una disminución de la cantidad de glutamina, un aminoácido esencial utilizado en muchos procesos anabólicos. El glufosinato de amonio es la sal de amonio de L-PPT. Solamente el L-isómero es un inhibidor de la glutamino sintasa. La enzima PAT expresada por el gen *pat* tiene la capacidad de conferir tolerancia al glufosinato de amonio a las plantas modificadas con este gen. La tolerancia al herbicida es una consecuencia de la acetilación y resultante desactivación de L-PPT en el herbicida glufosinato de amonio.

Figura 61. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.



La actividad enzimática de la proteína PAT sigue las cinéticas simples Michaelis-Menten (Wehrmann *et al.*, 1996). En presencia de acetyl-CoA como co-sustrato, la proteína PAT cataliza la acetilación del grupo amino libre de L-Fosfotricin (L-PPT) a N-acetil glufosinato (N-acetyl-L-PPT), un compuesto que no inactiva la glutamina sintetasa y no tiene actividad herbicida.

La enzima PAT es altamente específica para L-PPT. No acetila a otros L-aminoácidos, incluido el glutamato, que es estructuralmente el más parecido al L-glufosinato, ni al acetilato D-PPT. Un exceso de concentración de L-aminoácidos no afecta a la proteína PAT en su capacidad de acetilar L-PPT.

4. Proteína Vip3Aa19.

El evento COT102 codifica la toxina Vip3Aa19 de 780 aminoácidos, la cual pertenece al grupo de proteínas insecticidas vegetativas (Vip) producidas por *Bacillus thuringiensis*. Las proteínas Vip son producidas principalmente durante el crecimiento vegetativo de las bacterias y secretadas como proteínas solubles en el ambiente extracelular. Las proteínas Vip también continúan siendo producidas durante la fase estacionaria de crecimiento y esporulación. Por



esto, las proteínas Vip se encuentran presentes en los distintos bioinsecticidas comerciales formulados en base a *Bacillus thuringiensis*, teniendo por lo tanto las proteínas Vip un historial de uso seguro. El mecanismo de acción de esta proteína también asegura la no toxicidad para otros organismos que no sean insectos. Esta proteína requiere unirse a un receptor específico para que actúe como toxina y éste se encuentra sólo en algunas especies de insectos lepidópteros.

Al igual que las proteínas Cry, la proteína Vip3Aa19 de 89 kDa es activada proteolíticamente por la tripsina y los jugos gástricos produciendo un núcleo activo 60 kDa en el intestino medio de insectos lepidópteros, el cual se une competitivamente a las vesículas de la membrana de borde en cepillo en el epitelio del insecto (BBMV) y produce un poro en la membrana del intestino de especies susceptibles, sin embargo, se ha demostrado que Vip3Aa19 tiene propiedades de unión al receptor, así como propiedades de formación de poro significativamente diferentes a las proteínas Cry, lo cual indica que el modo de acción también es diferente a la familia de proteínas Cry (Lee *et al.*, 2003).

En adición a su actividad insecticida, no se conoce que las proteínas Vip tengan alguna otra actividad biológica o función catalítica. A pesar de la falta de homología con las proteínas Cry, se ha demostrado que las proteínas Vip también son altamente específicas y efectivas para el control de ciertas especies de insectos lepidópteros como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda* y *S. exigua* (van Frankenhuyzen and Nystrom, 2002), lo cual, aunado a sus propiedades diferentes de unión a receptor y formación de poro, representa una excelente herramienta para la prevención o manejo de resistencia de los insectos a las proteínas Cry.

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

5. Proteína APH4.

La enzima hygromycin-B phosphotransferase (APH4) codificada por el gen *aph4* de la bacteria *Escherichia coli*, funciona como marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico higromicina B (hygB), inactivándolo mediante la fosforilación del grupo hydroxyl (van den Elzen *et al.*, 1985). La higromicina es un antibiótico aminoglicósido que se une al sitio de unión ribosomal del factor de elongación 2 (EF-2) en las células procariontes. Consecuentemente, la elongación de la cadena de polipéptidos es inhibida y se interrumpe la síntesis de proteínas (Benveniste and Davies, 1973). El gen *aph4* está ampliamente distribuido en la naturaleza y confiere resistencia a un antibiótico que no tiene relevancia en medicina humana y tan sólo se le da un uso restringido en medicina veterinaria.

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.



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.

Cada gen transferido al algodón requiere de secuencias reguladoras que permitan su transcripción en RNA y su posterior traducción en forma óptima. Las secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes introducidos en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se presentan en el Cuadro 32. Aunque algunas secuencias reguladoras se derivan de patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV), virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV), estas secuencias no tienen capacidad de inducir enfermedades en el algodón.

Cuadro 32. Elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Gen/ Origen	Promotor	Elementos adicionales	Señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación 3'
GHB614			
2mepsps <i>Zea mays</i>	Ph4a748At Promotor del gen <i>H4</i> de la histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté <i>et al.</i> , 1987) que controla la expresión del gen <i>2mepsps</i> . El promotor Ph4a748, combinado con el <i>intron</i> del gen <i>II</i> de la histona variante H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet <i>et al.</i> , 1992) dirige una alto nivel de expresión constitutiva, especialmente en tejidos vegetales en rápido crecimiento.	TPotp C Péptido de tránsito optimizado que dirige la translocación de la proteína madura a los cloroplastos, sitio donde la proteína es funcionalmente activa (Lebrun <i>et al.</i> , 1996) Este péptido de tránsito se deriva de secuencias obtenidas de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo) de maíz y girasol, una enzima presente en todas las plantas fotosintéticas (Lebrun <i>et al.</i> , 1996).	3'histonAt Señal de poliadenilación de la región 3' no traducida del gen de la histona <i>H4</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté <i>et al.</i> , 1987)
T304-40			
cry1Ab <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	5'e1-Ps7s7 Promotor derivado del segmento 7 del genoma del virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV) con la región promotora duplicada (Boevink <i>et al.</i> , 1995). El promotor Ps7s7 está fusionado a la secuencia líder 5' de la secuencia no traducida del gen <i>GE1</i> específico del tapetum del arroz.	-	3'me1 Secuencia que contiene la región 3' no traducida del gen de la enzima 1 málico NADP derivado de <i>Flaveria bidentis</i> (Marshall <i>et al.</i> , 1996)
bar <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	P35S3 Secuencia que incluye la región promotora del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985). El promotor 35S dirige una alta expresión constitutiva y es ampliamente usado como promotor para la alta expresión de genes.	-	3'nos Secuencia que contiene la región no traducida del gen de la nopalina sintasa del T-DNA del plásmido pTiT37 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)



Gen/ Origen	Promotor	Elementos adicionales	Señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación 3'
GHB119			
cry2Ae <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. dakota	P35S3 Secuencia que incluye la región promotora del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985). El promotor 35S dirige una alta expresión constitutiva y es ampliamente usado como promotor para la alta expresión de genes.	TPssuAt Secuencia que codifica el péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa del gen <i>at1sA</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (De Almeida <i>et al.</i> , 1989). Esta secuencia regula un significativamente alto y estable nivel de la proteína codificada en las hojas. El péptido de tránsito se encuentra unido a la secuencia líder no traducida de la proteína de unión a la clorofila a/b de <i>Petunia hybrida</i> .	3'35s Secuencia que incluye la región 3' no traducida del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon <i>et al.</i> , 1991)
bar <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Pcsvmv XYZ Secuencia que contiene la región promotora del virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV) (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996). El promotor XYZ del CsVMV es activo en todos los órganos de la planta y tipos de células, lo que sugiere un patrón de expresión constitutiva.	-	3'nos secuencia que contiene la región no traducida del gen de la nopalina sintasa del T-DNA del plásmido pTiT37 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
COT102			
vip3Aa19 <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa AB88	Act2 Promotor del gen actina-2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Confiere la expresión constitutiva del gen <i>vip3Aa19</i> (An <i>et al.</i> , 1996)	-	3'nos Terminador del gen nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , esta secuencia termina la transcripción y proporciona un sitio de polyadenilación. Esta secuencia no codifica una proteína (Bevan <i>et al.</i> , 1983)
aph4 <i>Escherichia coli</i>	Ubq3int Promotor más el primer <i>intron</i> del gen <i>ubiquitina-e</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Confiere expresión constitutiva del gen <i>aph4</i> (Norries <i>et al.</i> , 1993)	-	3'nos Terminador del gen nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , esta secuencia termina la transcripción y proporciona un sitio de polyadenilación. Esta secuencia no codifica una proteína (Bevan <i>et al.</i> , 1983)



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

1. Organismo receptor – algodón (*Gossypium hirsutum*).

1.1. Usos del algodón.

El algodón es cultivado principalmente por el valor de su fibra, siendo la semilla de algodón y los productos procesados a partir de ella, subproductos del cultivo. Uno de los sub-productos de algodón es el aceite de su semilla; éste ha sido empleado para el consumo humano por décadas. Es considerado un aceite de buena calidad, con gran valor por su alto contenido de ácidos grasos no saturados.

Otro uso de la semilla de algodón se encuentra en el *linter* (especie de pelusa adherida a la semilla), compuesto en más del 99% por celulosa. La presencia de gopipol, una toxina natural presente en las plantas y semillas de algodón, limita el uso del cultivo y algunos de sus sub-productos como alimento humano y animal. De todas formas, estas toxinas son removidas en la producción de aceite y linter, haciendo que sea adecuado para el consumo humano. Entre los alimentos que pueden derivar del aceite de semilla de algodón se encuentran los aceites para frituras, la mayonesa, los aderezos para ensaladas, las grasas y las margarinas. Asimismo, luego de su procesamiento, el linter puede ser usado en la preparación de productos alimenticios con alto contenido de fibra, en espesantes para helados y aderezos de ensaladas.

Sólo el capullo de algodón es útil para obtener fibras textiles así como para alimento humano o animal. Las partes restantes de la planta son dejadas en el terreno para su descomposición como abono vegetal. Históricamente el algodón ha sido cosechado a mano, pero en la actualidad en los países industrializados se le cosecha principalmente en forma mecánica.

La industrialización del algodón se inicia con el despepite de los capullos, proceso que separa la semilla de la fibra. Los subproductos del despepite siguen recorridos distintos; la fibra es requerida por las fábricas textiles, los restos de fibras y linter se utilizan en la fabricación de papel, algodón hidrófilo (materia prima para pañales desechables) y como alimento, y finalmente la semilla se utiliza para la siembra, elaboración de aceites y consumo animal.

1.2. Semilla de algodón para alimentación animal²⁰.

La semilla de algodón que se utilizará para alimentación de vacas lecheras es tratada y almacenada de la misma manera que la semilla destinada a ser molida. Esto es importante porque la semilla de algodón se puede deteriorar rápidamente si no se almacena bajo niveles apropiados de humedad y temperatura. Las grandes instalaciones de almacenamiento ventiladores de secado y equipamiento de control de temperatura presente en molinos aceiteros son ideales para mantener la calidad de la semilla del algodón, la cual puede ser utilizada como alimento o para molienda muchos meses después de su cosecha. Muchos molinos de semilla de algodón venden la semilla completa a la industria lechera, los cuales valoran a la semilla por su alta energía y contenido de proteína. La alimentación con semillas oleaginosas y especialmente semillas de algodón, es una de las formas que tiene la industria lechera, para proveer nutrientes concentrados, particularmente energía, a vacas lecheras de alta producción, algunos molinos de aceite también

²⁰ Basado en FAO (Food and Agriculture Organization - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Sistema de información de los recursos del pienso. *Gossypium spp.* www.fao.org



venden a lecheros semilla de algodón deslizada. Cuando se remueve el linter, el valor nutritivo para vacas lecheras de la semilla remanente aumenta levemente.

1.3. Productos derivados de semilla de algodón.

1.3.1. Aceite de semilla de algodón.

En años recientes los rendimientos de toda la industria de sub-productos de algodón promediaron cerca de 145 kg de aceite, 412 kg de harina, 245 kg de cáscara y 75 kg de *linter* por tonelada de semilla, con pérdidas por manufactura de 28.5 kg/ton. Estos rendimientos promedio varían de área a área, año a año y molino a molino, dependiendo de las características de la semilla, el tipo de proceso utilizado y las condiciones del mercado. De los cuatro productos primarios producidos por las plantas de procesamiento de semilla de algodón, el aceite es el más valioso. En promedio, representa cerca del 40 - 50% del valor total de los cuatro productos. El aceite de semilla de algodón es utilizado principalmente como alimento para humanos.

Las grasas y los aceites juegan un rol de vital importancia en la dieta humana. Las grasas son las formas más concentradas de energía, proveyendo más del doble de las calorías de energía por unidad de peso de la que es provista por las proteínas o carbohidratos. Además de proveer energía, las grasas son la única fuente de ciertos ácidos grasos esenciales que no son fabricados por el cuerpo pero son esenciales para el crecimiento y adecuado funcionamiento. Son buenos portadores de varios grupos de vitaminas A, D, E y K y ayudan al cuerpo a absorber otro tipo de elementos alimenticios vitales. Además de su valor directo como alimento, las grasas y aceites mejoran el sabor de otras comidas y, por lo tanto, contribuyen al disfrute y digestión. Hasta la segunda guerra mundial, el aceite de semilla de algodón era el aceite vegetal principal en los Estados Unidos de América. Actualmente se encuentra en tercer lugar en volumen, tras el aceite de soya, maíz y canola (NCPA, 1999; FAOSTAT, 2006. <http://apps.fao.org/> accedido septiembre, 2006).

El aceite de semilla de algodón para consumo humano, requiere de un segundo procesamiento, luego de la extracción por solvente, los niveles de gosispol en el aceite se reducen cerca de la mitad mediante un proceso de refinamiento (Freyssinet, 2007), seguido de procesos de decoloración y deodorización, para obtener un aceite con la calidad necesaria para el consumo humano.

La composición del aceite de semilla de algodón (refinado, decolorado y deodorizado) contiene típicamente un 27% de ácidos grasos saturados, 18% de mono-insaturados y 55% de poliinsaturados, el contenido de tocoferol del aceite de semilla de algodón es de 65 mg/100 mL (35 mg α -tocopherol y 30 mg de β -tocopherol) para un α -tocopherol equivalente a 38 mg/100 mL.

1.3.2. Torta de semilla de algodón como alimento animal.

La torta de semilla de algodón es el segundo producto más valioso de la semilla de algodón, siendo generalmente un tercio del valor total del producto. Puede venderse como harina, torta, copos o pellet. La torta de semilla de algodón se utiliza principalmente como alimento para ganado y es vendido usualmente a un 41% del nivel de proteínas. Su valor principal es como concentrado proteico.

La mayoría de los granos y forraje de granja son deficientes en las proteínas necesarias para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de animales. La torta de semilla de algodón, un



suplemento disponible destacado, provee de tres a seis veces la cantidad de proteína de la mayoría de los granos y de 10 a 20 veces la de los forrajes de baja calidad. Cuando se utiliza solo en la cantidad necesaria para balancear en ración, medio kilo de harina sirve para ahorrar de 1.2 a 1.3 kilos de grano. Además de su alto contenido proteico y su alto valor energético, la torta de semilla de algodón. Además de su alto contenido proteico y su valor energético, la torta de semilla de algodón posee valores más elevados de fósforo que cualquier otra proteína vegetal.

La torta de semilla de algodón puede ser utilizada en cierta medida en las raciones de todas las clases de ganado. Es suficiente como fuente única de proteínas para rumiantes maduros como ganado y ovejas y puede proveer gran parte de la proteína para vacas lecheras, además se sabe que toda torta de semilla de algodón de alta calidad, utilizada correctamente, como un ingrediente formulado adecuadamente para raciones de cerdos y aves de corral, mejora la economía y la eficiencia.

1.3.3. Linter de semilla de algodón.

El *linter* de semilla de algodón, las fibras cortas que son removidas de la semilla como un primer paso en el procesamiento, es a veces llamado las “pelusas fabulosas”. El *linter* difiere en varias formas de las fibras largas de algodón para las cuales el algodón es cultivado. El *linter* no tiene lumen, se adhiere a la cáscara más fuertemente y frecuentemente está pigmentado, y es más rústico que las fibras comunes. Su diámetro es cerca del doble de la fibra de algodón. El *linter* puede utilizarse ya sea intacto o disuelto para proveer una cama de celulosa (pulpa de *linter*) para fabricar plástico y rayón. Hay una amplia variedad de productos potenciales que pueden fabricarse a partir de celulosa de *linter* disuelta, los cuales incluyen films de acetato de celulosa y explosivos de nitrato de celulosa. El *linter* sin disolver puede utilizarse para futones, colchones, productos absorbentes médicos e higiénicos y finos papeles de escritura, como también para el papel moneda (NCPA, 2000c).

Luego de extensivos procesamientos a pH alcalino y altas temperaturas, el *linter* de la semilla de algodón puede utilizarse como un producto dietético de alta fibra. Productos comestibles de fibra de *linter* de semilla de algodón contienen más de un 99% de fibra total. El producto es una harina color blanco puro, sin sabor y sin olor. Químicamente estable, por lo que no reacciona con otros ingredientes para dar sabores colores u olores desagradables en alimentos. Es utilizado en muchos productos alimenticios incluyendo productos horneados, aderezos, refrigerados y alimentos procesados. La fibra de *linter* se utiliza también para mejorar la viscosidad de aderezos y es utilizada comúnmente para unir sólidos en preparados farmacéuticos como tabletas, ayuda a retener la humedad y por lo tanto prolongar la vida de anaquel de productos horneados. Ya que la fibra de *linter* es blanca y es una de las formas más puras de fibra, tiene obvias ventajas sobre otras fuentes de fibras comestibles como pulpa de madera.

1.3.4. Semilla de algodón deslintada.

El deslintado aumenta la densidad de nutrientes y el flujo del producto. En la mayoría de los procesos de deslintado se utiliza un método mecánico para remover el *linter*, el cual deja entre un 1 - 2% de *linter* residual en la semilla. El deslintado ácido es un proceso químico que remueve todo el *linter* y se utiliza para la preparación de semilla para siembra. El apisonamiento o resquebrajamiento de la semilla de algodón antes de su uso como alimento puede mejorar su utilización (NCPA, 2006).



2. Organismos donadores para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

Los organismos donadores de los genes *2mepsps*, *cry1Ab*, *cry2Ae*, *vip3Aa19*, *bar* y *aph4* son plantas utilizadas comúnmente como alimento humano o animal, o bien bacterias que habitan de manera natural en el suelo o en el intestino humano y que han sido utilizadas como fuentes de genes para mejorar los atributos de varios cultivos en los últimos 20 años, sin que se hayan encontrado evidencias de efectos patogénicos, tóxicos o alergénicos para humanos y animales (www.isaaa.org; <https://bch.cbd.int/>).

Las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Streptomyces hygroscopicus* no son utilizadas como alimento humano ni como alimento o suplemento en nutricional animal. Ninguna de las bacterias utilizadas como donantes de genes tiene antecedentes de ser tóxicas para humanos o animales. De todas maneras, es importante considerar que para la obtención del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 no se utilizan bacterias completas sino solo uno de sus genes. Los estudios bio-informáticos y biológicos realizados demuestran que ninguna de las proteínas codificadas por los genes utilizados tiene efectos potencialmente tóxicos ni alergénicos.

2.1. Maíz (*Zea mays*).

El maíz es uno de los granos de mayor cultivo en todo el mundo, motivo por el cual se puede decir que tanto la semilla como cualquier derivado cuenta con un historial de uso seguro en alimentación/uso humana y animal. Los pueblos indígenas del hemisferio occidental han utilizado el grano de maíz desde tiempos ancestrales. El maíz se cultiva comercialmente en más de 100 países, con un total cosechado de más de 590 millones de toneladas métricas. Los principales productores de maíz son Estados Unidos, China, Brasil, México, Francia y Argentina. El maíz se cultiva principalmente por sus granos, los cuales en su mayor parte se someten a un proceso de refinado para obtener productos utilizados en una amplia variedad de artículos alimenticios, médicos e industriales.

El maíz es un producto alimenticio básico en México y el consumo nacional *per capita* es de 187 kg (García, 2012). El 68% de la producción de maíz en México se consume directamente como alimento, en comparación con el promedio global de 21%. Bourges (2002), en un estudio sobre dietas mexicanas reportó que el grano de maíz, consumido en forma de tortillas, constituía un promedio del 59% de la ingesta de fuentes de energía y el 39% de la ingesta de proteínas.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Liliopsida (monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae/Gramineae
Género	<i>Zea</i> L.
Especie	<i>Zea mays</i> L.

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).



2.2. *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva, facultativa anaeróbica que forma inclusiones de proteína adyacente a la endospora. Las subespecies de *B. thuringiensis* pueden sintetizar más de una inclusión parasporal. Estas inclusiones están formadas por diferentes proteínas cristal insecticida (PCI) (Soberon y Bravo, 2007).

Los cristales o el complejo de espora/cristal de un Bt esporulado deben ser ingerido por las larvas susceptibles. La eficacia de los cristales en el intestino medio del insecto depende de la solubilización de los cristales, de la conversión de la protoxina a la toxina biológicamente activa por las enzimas proteolítica, de los receptores específicos ensamblado por el dominio terminal-C de la toxina activa y la formación de un poro por el dominio terminal-N con el rompimiento de las células epiteliales. La germinación de la espora y la proliferación de las células vegetativas dentro del homocelo del insecto podrían resultar en una septicemia contribuyendo a la muerte del insecto. Los receptores ensamblados por el cristal es el principal determinante de la especificidad del hospedero debido a la existencia de diferentes cristales presentes en cada una de las cepas de Bt.

Un gran número de subespecies de *B. thuringiensis* se han aislados de larvas muertas principalmente del Coleóptera, Díptera y Lepidóptera, pero muchas de las subespecies se han aislados del suelo, de las superficies de hojas y de otros hábitats. Los insectos muertos frecuentemente contienen grandes cantidades de esporas y cristales que pueden entrar al ambiente. Las subespecies de Bt que son activas contra coleópteros y lepidópteros están asociadas con el suelo y la superficie de hojas, mientras que las subespecies activas contra dípteros se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos. En el ambiente, las esporas persisten y el crecimiento vegetativo podría ocurrir cuando las condiciones son favorables y los nutrientes están disponibles.

Reino	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)

2.3. *Streptomyces hygroscopicus*.

Streptomyces hygroscopicus es una bacteria en forma de bacilo, gram positiva, aeróbica, filamentosa, formadora de bio-películas y habitante natural del suelo. Pertenece al grupo de los Actinomycetes y son bacterias que comparten muchas características con los hongos. Estas bacterias crecen usualmente como filamentos (cadenas de células) que usualmente se ramifican para formar redes de filamentos en el suelo (micelio). En la punta de los filamentos se desarrollan cadenas de esporas de longitud indefinida. Estas bacterias son las responsables del olor a humedad del suelo. Algunas bacterias del género *Streptomyces* producen antibióticos tales como la estreptomina. En el caso de la especie *Streptomyces hygroscopicus* produce el antibiótico milbemicina, el cual es usado como insecticida y también para controlar algunas infecciones parasitarias en animales. Estas bacterias también forman bio-películas, las cuales son



acumulaciones de bacterias en ambientes acuosos formadas por secreciones de materiales viscosos y mucilaginosos que proveen a la bacteria de un medio para adherirse a la mayoría de las superficies. *S. hygroscopicus* tiene una amplia distribución en la naturaleza y no se considera patógeno para humanos, animales o plantas (OECD, 1999).

Reino	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Orden	Actinomycetales
Familia	Streptomycetaceae
Género	<i>Streptomyces</i>
Especie	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)

2.4. *Escherichia coli*.

El organismo donador del gen *aph4* utilizado como marcador de selección es la bacteria *Escherichia coli* cepa K12. *E. coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, la cual comprende un grupo relativamente homogéneo de bacterias en forma de bacilo, Gram-negativas, aeróbicas y facultativas. Las bacterias del género *Escherichia* son ubicuas en el ambiente y son habitantes comunes del tracto digestivo de los vertebrados, incluyendo los humanos (Souza *et al.*, 2001).

La cepa de laboratorio K12 de *E. coli* ha sido intensamente utilizada como un organismo modelo en gran cantidad de estudios y tiene un largo historial de uso seguro, es particularmente utilizada en sistemas de producción comercial de proteínas tanto en la industria farmacéutica, como en la industria alimenticia (Bogosian and Kane 1991).

Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>Escherichia coli</i> cepa K12

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)

3. Organismos donadores de los elementos reguladores.

Cada gen transferido al algodón requiere de secuencias reguladoras que permitan su transcripción en RNA y su posterior traducción en forma óptima. Aunque algunas secuencias reguladoras se derivan de patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV), virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV), estas secuencias no tienen capacidad de inducir enfermedades en el algodón.



3.1. *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gram negativas, flageladas, peritricas; forma colonias mucoides y blancas. La composición de bases de DNA varía de 58 a 63.5% GC.

A. tumefaciens es un fitopatógeno que habita de manera natural en el suelo. Cuando *Agrobacterium* es aislada de las raíces de las plantas en ambientes naturales o bajo cultivo, la mayoría de las cepas (más del 90%) no son patogénicas, aun cuando muchos aislamientos son hechos de plantas enfermas. Por lo tanto, *Agrobacterium* es esencialmente un habitante de la rizosfera y únicamente una proporción muy pequeña de cepas son fitopatógenas (contienen el plásmido Ti), las cuales causan la enfermedad conocida como agalla de la corona en un amplio rango de plantas dicotiledóneas especialmente rosáceas como manzana, pera, durazno, cereza, almendra, frambuesa y rosal. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de un tumor al nivel del suelo y aunque reduce el valor comercial de la cosecha, generalmente no causa problemas serios en plantas maduras bien establecidas. La bacteria entra a la planta a través de heridas y transfiere una fracción de su ADN, denominada T-DNA, a las células de las plantas causando la formación de un tumor. El tumor se desarrolla debido a que el T-DNA contiene genes que regulan la biosíntesis de hormonas vegetales como el ácido indolacético y citocininas. Las células infectadas producen unas sustancias denominadas opinas, las cuales son usadas por la bacteria como fuente de energía. El desarrollo de los síntomas en la planta infectada depende de la temperatura, humedad y estado de crecimiento; conforme el tumor incrementa su tamaño la habilidad de la planta para obtener nutrientes disminuye y finalmente detienen su crecimiento con lo cual también empieza la decadencia del tumor liberando las bacterias en el suelo. La bacteria puede permanecer activa en el suelo o en tumores viejos en ausencia de un hospedero adecuado durante un mínimo de dos años y puede dispersarse a través del movimiento de suelo infectado, implementos agrícolas, escurrimiento de agua o a través de insectos succionadores de savia (López, 1994).

Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rhizobiales
Familia	Rhizobiaceae
Género	<i>Agrobacterium</i>
Especie	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Fuente: Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org>)

3.2. *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea anual de ciclo corto con una altura comprendida entre los 10 y 30 cm, miembro de la familia Brassicaceae, sin valor comercial con presencia en los 5 continentes, utilizada en biología molecular como planta modelo para dicotiledóneas. Planta de tallo erecto con ramificación un poco alejada de la base. Las hojas son simples de elípticas a ovales con los bordes enteros. Tiene dos tipos de hojas, las basales de hasta 2 cm de largo por 0.5 cm de ancho, arrosadas y las caulinares (las que están a lo largo del tallo), éstas son más pequeñas y sésiles esto es carentes de pecíolo. Las inflorescencias se presentan en racimos, en el extremo de las ramas o el tallo, no demasiados compactos, éstas se van separando unas de otras



a medida que el tallo crece, por lo que los pedúnculos de los frutos maduros estarán separados del orden de un centímetro entre ellos. Las flores son hermafroditas de unos 0.5 cm de diámetro, normalmente con cuatro pétalos blancos, espatulados. Se distinguen en ella sin dificultad todos los órganos florales. El fruto es una silicua linear que aparece del centro de la flor, alargado, de unos 3 cm de longitud y 1 mm de ancho, cilíndrico, un poco arqueado y sin pubescencia. Estos contienen dos cavidades en las que se alojan las semillas ovoideas en hilera, sin tocarse entre ellas, en número elevado; unas 30 por silicua. En la madurez tienen un color anaranjado son lisas y miden medio milímetro aproximadamente.

Elegida como especie modelo por su minúsculo tamaño, rapidez de reproducción, gran número de semillas por planta, genoma compacto (125 mega pares de bases) y la facilidad de realizar cruces y transformación genética. Los atributos de *Arabidopsis* que permiten su utilización experimental han permitido que en menos de 15 años sea considerada la especie mejor entendida de todo el reino vegetal. Al analizar el genoma de esta planta, se encontró que se trata de un genoma muy pequeño pero con un gran número de genes y que un 8% concuerda con genes animales, sobre todo los vinculados con el metabolismo primario (síntesis de elementos básicos, como azúcares o lípidos). *Arabidopsis* comparte genes funcionales (germinación, floración, formación de semillas) con otras plantas como el arroz, la soya, el trigo, el maíz y el algodón. En el año 2000 se presentó por vez primera el genoma completo de una planta, el de *Arabidopsis thaliana*, en el que se identificaron 25,498 genes que codifican proteínas para 11,000 familias (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Dilleniidae
Orden	Capparales
Familia	Brassicaceae/Cruciferae
Género	<i>Arabidopsis</i> Heynh.
Especie	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>)

3.3. *Zea mays*.

El maíz es uno de los granos de mayor cultivo en todo el mundo, motivo por el cual se puede decir que tanto la semilla como cualquier derivado cuenta con un historial de uso seguro en alimentación/uso humana y animal. Los pueblos indígenas del hemisferio occidental han utilizado el grano de maíz desde tiempos ancestrales. El maíz se cultiva comercialmente en más de 100 países, con un total cosechado de más de 590 millones de toneladas métricas. Los principales productores de maíz son Estados Unidos, China, Brasil, México, Francia y Argentina. El maíz se cultiva principalmente por sus granos, los cuales en su mayor parte se someten a un proceso de refinado para obtener productos utilizados en una amplia variedad de artículos alimenticios, médicos e industriales.

El maíz es un producto alimenticio básico en México y el consumo nacional *per capita* es de 187 kg (García, 2012). El 68% de la producción de maíz en México se consume directamente como



alimento, en comparación con el promedio global de 21%. Bourges (2002), en un estudio sobre dietas mexicanas reportó que el grano de maíz, consumido en forma de tortillas, constituía un promedio del 59% de la ingesta de fuentes de energía y el 39% de la ingesta de proteínas.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Liliopsida (monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae/Gramineae
Género	Zea L.
Especie	Zea mays L.

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

3.4. *Helianthus annuus*.

El girasol (*Helianthus annuus*) es una planta que tiene un largo historial de uso seguro; tanto la semilla como el aceite son ampliamente consumidos de manera directa o como ingrediente en una gran cantidad de alimentos procesados (USA Sunflower Association: www.girasol-usa.com).

Es una planta herbácea, anual, de gran porte, que puede alcanzar los 2 m de altura. Para su óptimo desarrollo necesita de una gran cantidad de horas de insolación y mucha humedad. Posee hojas de forma triangular, ásperas al tacto. Los frutos, que popularmente se denominan "pipas", son grandes, de unos 2 cm de largo y de color blanco, gris o negro, según la variedad de que se trate.

La floración se produce en los meses de verano. Esta planta tan peculiar debe su nombre al hecho de que mueve su inflorescencia siguiendo el movimiento solar, de forma que al amanecer la orienta hacia el este y continúa girando a medida que avanza el día, hasta quedar orientada hacia el poniente; así, los rayos solares inciden perpendicularmente sobre ella. Las inflorescencias son muy grandes, lo que en ciertas ocasiones hace que el tallo se incline por su propio peso; a su alrededor se encuentran unas lígulas alargadas de color amarillo. La recolección se efectúa cuando las semillas están maduras (www.oleaginosas.org).

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae/Compositae
Género	<i>Helianthus</i> L.
Especie	<i>Helianthus annuus</i> L. (girasol)

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).



3.5. *Oryza sativa*.

El arroz es uno de los cereales más valiosos en México y en el mundo por su alto contenido de energía y proteínas. Tiene una gran variedad de usos para consumo humano en diversos platillos y bebidas, así como para la elaboración de alimento balanceado para ganado.

La planta del arroz tiene un tallo cilíndrico formado de nudos y entrenudos alternados con hojas seguidos de secciones sin ellas. Su altura va desde sesenta hasta 120 cm. Las hojas son largas y planas. En el punto donde la hoja se une al tallo, hay una lígula con una serie de cirros largos y sedosos. Las flores del arroz son de color verde blanquecino dispuestas en espiguillas, que en conjunto se denominan panoja. Una vez que ha floreado, las espigas son estrechas y colgantes. El grano de arroz es el ovario maduro. Cuando se le quita la cáscara pardusca o pericarpio, se dice que se ha pulido. De otra forma, se trata de arroz integral, preferido por muchas personas por su alto contenido de fibra (www.siap.gob.mx).

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Liliopsida (monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae/Gramineae
Género	<i>Oryza</i> L.
Especie	<i>Oryza sativa</i> L. (arroz)

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

3.6. *Flaveria bidentis*.

Flaveria bidentis es una planta anual con una altura de alrededor de 50 cm; su tallo es generalmente de color púrpura; hojas opuestas, sésiles (sus bases unidas al tallo y a la hoja opuesta), angostas, de hasta 5 cm de largo y hasta 0.6 cm de ancho, a veces con el margen aserrado. Las flores se agrupan en cabezuelas apretadas sobre numerosos ejes cuyo ápice tiende a enroscarse, ubicados hacia la punta de los tallos formando una inflorescencia de aspecto redondeado. Cada inflorescencia está formada por 5 a 11 flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo pequeño que no presenta brácteas (páleas), el conjunto de flores está rodeado por fuera por 5 brácteas (que constituyen el involucre) oblongo-ovadas o con forma de "lancha". Frecuentemente se presenta otra bráctea diminuta en la base del involucre. Flores liguladas una o bien ausentes, fértil, la corola es un tubo en la base y a manera de cinta hacia el ápice, semejando el pétalo de una flor sencilla, de aproximadamente 3 mm de largo, casi circular, amarilla. Flores del disco 5 a 10, hermafroditas, la corola mide aproximadamente 2 mm de largo y es un tubo que hacia el ápice se ensancha (con forma de embudo) y se divide en 5 lóbulos, de color amarillo. Cáliz ausente. El fruto es un aquenio y no se abre (indehiscente), contiene una sola semilla, es más o menos cilíndrico aunque a veces algo más ancho hacia el ápice, algo comprimido y acostillado, mide aproximadamente 1 mm de largo (cuando se presenta, el fruto de la flor ligulada es ligeramente más largo), sin vilano (www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/).



Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae/Compositae
Género	<i>Flaveria</i> Juss.
Especie	<i>Flaveria bidentis</i> (L.) Kuntze

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

3.7. *Petunia hybrida*.

Petunia hybrida es una planta perenne que alcanzan entre 15 y 45 cm de altura; las hojas están dispuestas de forma alterna u opuestas, son ovaladas, alargadas y de bordes enteros, bastante oscuras y pegajosas. Las flores son solitarias y axilares con cáliz tubular y corola en forma de trompeta, miden entre 5 y 13 cm de diámetro. Las petunias son plantas ornamentales muy conocidas. Desarrollan una abundante floración durante un largo periodo; desde la primavera hasta finales de otoño.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Petunia</i> Juss.
Especie	<i>Petunia hybrida</i> Vilm

Fuente: USDA-Natural Resources Conservation Service (<http://plants.usda.gov/>).

3.8. Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV).

El virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV) es un Nanovirus con un rango de hospedantes restringido principalmente a especies de la familia Fabaceae como trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), alfalfa (*Medicago sativa*), chícharo (*Pisum sativum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). En la naturaleza este virus es transmitido únicamente por afidos como *Aphis craccivora*, *A. gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae*. No se conocen efectos tóxicos para el hombre del virus de la atrofia subterránea del trébol.

Phylum	-
Clase	-
Orden	-
Familia	Nanoviridae
Género	Nanovirus



Especie Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV)

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/>).

3.9. Virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

El virus del mosaico de la coliflor (CaMV) es un Caulimovirus con un rango de hospederos restringido principalmente a plantas de la familia *Brassicaceae* (col, coliflor, colza, mostaza); aunque también se ha reportado de manera esporádica en cacahuate, soya y casava. No se conocen efectos tóxicos para el hombre del virus en mosaico de la coliflor. Los Caulimovirus representan uno de los dos grupos de pararetrovirus vegetales que incluye al promotor 35S. El otro grupo, Badnavirus, se encuentra en forma natural en banana, cacao, cítricos, camote, piña y caña de azúcar. Las partículas del CaMV contienen una molécula circular de DNA de doble cadena. En el núcleo de las plantas hospedantes el DNA se presenta como mini-cromosoma cuya transcripción produce moléculas de RNA. Este RNA es el templado para la transcriptasa reversa que produce copias de DNA del CaMV que será empacado en nuevas partículas virales. El RNA se utiliza para la síntesis directa de proteínas virales entre las que se incluye las que integran la cápside.

Phylum	-
Clase	-
Orden	-
Familia	Caulimoviridae
Género	Caulimovirus
Especie	Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/>).

3.10. Virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV).

El virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV) es un Caulimovirus que infecta las plantas de cassava (*Manihot esculenta*) en Brasil. El CsVMV tiene partículas esféricas de 50 a 60 nm de diámetro que se observan como cuerpos de inclusión citoplasmáticos y contienen una molécula circular de DNA de doble cadena (dsDNA). El CsVMV es particularmente importante en la biotecnología vegetal debido a que posee un promotor que dirige una alta expresión de transgenes en diferentes plantas, así como en protoplastos, y ha sido utilizado en el desarrollo de plantas con tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos y enfermedades (Rao, 2015; Verdaguer *et al.*; 1998).

Phylum	-
Clase	-
Orden	-
Familia	Caulimoviridae
Género	Cavemovirus
Especie	virus del mosaico de la nervadura de la yuca (CsVMV)

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/>).



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.

Los genes de selección utilizados durante la fase de laboratorio para cada evento parental (GHB614, T304-40, GHB119 y COT102) se presentan en el [Cuadro 33](#).

Cuadro 33. Resumen de los genes de selección utilizados para la obtención de los eventos parentales del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Evento	Gen de selección	Organismo donador	Producto del gen	Función
GHB614	<i>2mepsps</i>	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (mEPSPS) tolerante a glifosato	Disminuye la afinidad con el glifosato y, por lo tanto, aumenta la tolerancia a este herbicida
T304-40	<i>bar</i>	Bacteria (<i>Streptomyces hygrosopicus</i>)	Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación
GHB119	<i>bar</i>	Bacteria (<i>Streptomyces hygrosopicus</i>)	Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación
COT102	<i>aph4 (hptI)</i>	Bacteria (<i>Escherichia coli</i>)	Enzima hygromycin-B phosphotransferase (hph)	Marcador de selección mediante resistencia al antibiótico Higromicina B

1. Gen *2mepsps*.

El gen de interés *2mepsps* también fue utilizado como marcador de selección para el evento GHB614. Este gen codifica la producción de la enzima 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS), la cual es insensible a la acción del herbicida glifosato, permitiendo la selección de las plantas por la tolerancia que les confiere a la aplicación de dicho herbicida.

El evento GHB614 produce la proteína 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS) codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz (*Zea mays* L.) (Herouet-Guicheney *et al.*, 2009). El gen *2mepsps* consta de 1338 pb y ha sido modificado a través de mutagénesis sitio-dirigida para codificar una enzima insensible a la desactivación por glifosato (Lebrun *et al.*, 1997). Para restaurar el sitio de escisión del péptido de tránsito se adicionó el aminoácido metionina en N-terminal de la secuencia de la proteína 2mEPSPS (De Beuckeleer, 2003), la cual está constituida por 445 aminoácidos y un peso molecular de ~47.5 kDa. La expresión de la proteína 2mEPSPS confiere tolerancia a las plantas de algodón al herbicida glifosato.

El mecanismo de acción del glifosato consiste en la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en la ruta metabólica del shikimato (Sikorski & Gruys, 1997). La inhibición de la enzima EPSPS por el glifosato bloquea esta ruta metabólica, lo cual eventualmente provoca la muerte de la célula (Steinrucken & Amrhein, 1980). La enzima EPSPS cataliza la transferencia reversible del grupo enolpiruvil desde el fosfenol piruvato (PEP) (PEP) al 5-hidroxil de shikimato-3-fosfato (S3P) resultando en la formación de fosfato inorgánico y 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) (Alibhai y Stallings, 2001), sitio de inhibición por el glifosato. Este es el único producto metabólico conocido y 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato es el penúltimo producto de la vía del ácido shikímico. El ácido shikímico es un sustrato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) como también de varios

metabolitos secundarios, como el tetrahidrofolato, la ubiquinona y la vitamina K. Es importante destacar que la vía del shikimato y, por lo tanto, las proteínas EPSPS no están presentes en mamíferos, peces, aves, reptiles e insectos (Bentley, 1990; Alibhai & Stallings, 2001; Eschenburg *et al.*, 2002). En contraste, se ha calculado que las moléculas aromáticas, todas derivadas del ácido shikímico, representan el 35% o más del peso seco de una planta (Franz *et al.*, 1997). La unión del sustrato a la enzima es secuencial, iniciando con la unión del S3P y posteriormente el PEP (Boocock and Coggins, 1983). La reacción catalizada por la enzima EPSPS inicia con el rompimiento del enlace C-O del PEP (Walsh *et al.*, 1996).

2. Gen *bar*.

El gen de interés *bar* también fue utilizado como marcador para la selección de los eventos T304-40 y GHB119. Este gen codifica la producción de la enzima phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT), la cual es insensible a la acción del herbicida glufosinato de amonio, permitiendo la selección de las plantas por la tolerancia que les confiere a la aplicación de dicho herbicida.

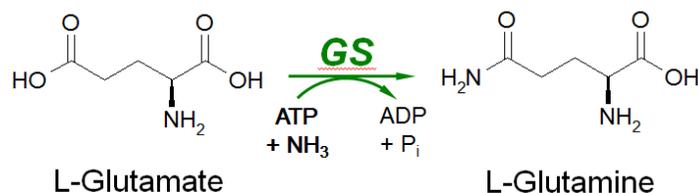
Los eventos T304-40 y GHB119 contiene el cassette de expresión *bar* que cuando se transcribe, origina la proteína PAT de ~21 kDa que consiste de un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La secuencia del gen *bar* proviene de *Streptomyces hygroscopicus* y codifica la proteína phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confiere tolerancia a glufosinato de amonio (L-fosfinotricina).

El herbicida glufosinato es una mezcla racémica de formas D y L de fosfinotricina, aunque sólo la forma L (L-fosfinotricina) tiene actividad herbicida. Este herbicida es un potente inhibidor de la enzima glutamino sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une competitivamente a la enzima GS desplazando al L-glutamato del sitio activo (OECD, 1999; OECD, 2002a) (Figura 62).

La enzima glutamino sintetasa (GS) es esencial en el metabolismo de nitrógeno en plantas superiores, donde es la única enzima en plantas que puede detoxificar el amoníaco liberado por la reducción de nitrato, degradación de aminoácidos y fotorespiración. El amoníaco, aun siendo un nutriente vegetal es tóxico si se encuentra en exceso y lleva a la muerte de la célula vegetal (OECD, 1999; OECD, 2002a).

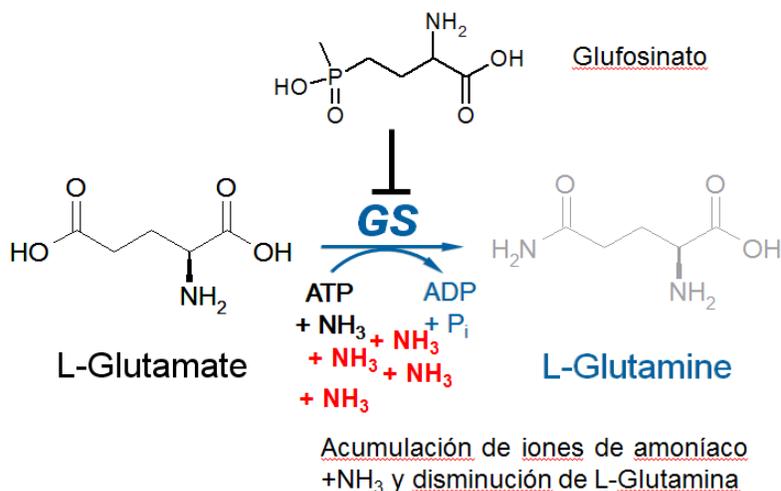
Figura 62. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.

a) Asimilación del amoníaco.



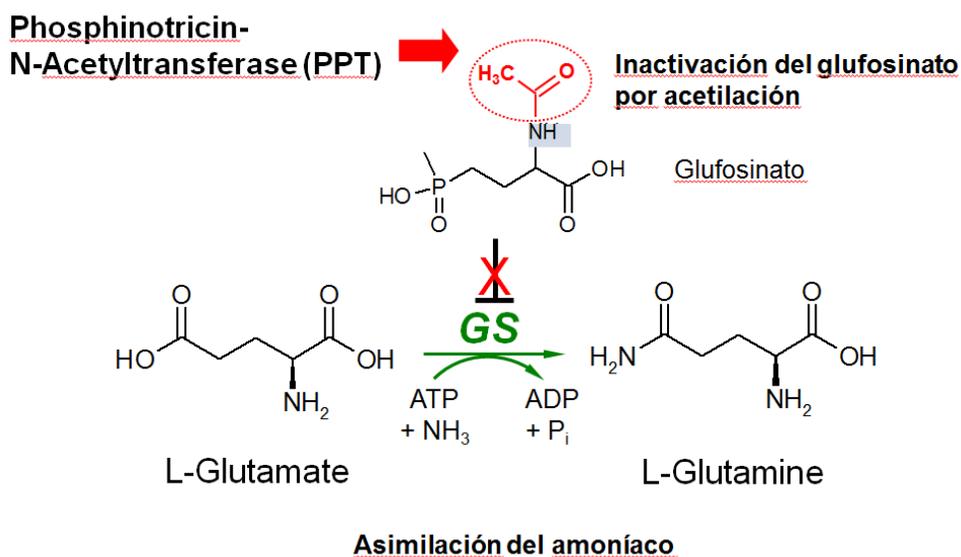
GS: Glutamine synthase

b) Inhibición de la enzima GS.



La enzima PAT es una acetiltransferasa que cataliza específicamente la acetilación de L-fosfotricin (L-PPT) y demetilfosfotricin (DMPT) (Thompson *et al.*, 1987). L-PPT y DMPT son inhibidores de la enzima glutamino sintasa (GS). Esta inhibición resulta en la acumulación de iones de amoníaco tóxicos y una disminución de la cantidad de glutamina, un aminoácido esencial utilizado en muchos procesos anabólicos. El glufosinato de amonio es la sal de amonio de L-PPT. Solamente el L-isómero es un inhibidor de la glutamino sintasa. La enzima PAT expresada por el gen *bar* tiene la capacidad de conferir tolerancia al glufosinato de amonio a las plantas modificadas con este gen. La tolerancia al herbicida es una consecuencia de la acetilación y resultante desactivación de L-PPT en el herbicida glufosinato de amonio.

Figura 63. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.





La actividad enzimática de la proteína PAT sigue las cinéticas simples Michaelis-Menten (Wehrmann *et al.*, 1996). En presencia de acetyl-CoA como co-sustrato, la proteína PAT cataliza la acetilación del grupo amino libre de L-Fosfotricin (L-PPT) a N-acetil glufosinato (N-acetyl-L-PPT), un compuesto que no inactiva la glutamina sintetasa y no tiene actividad herbicida.

La enzima PAT es altamente específica para L-PPT. No acetila a otros L-aminoácidos, incluido el glutamato, que es estructuralmente el más parecido al L-glufosinato, ni al acetilato D-PPT. Un exceso de concentración de L-aminoácidos no afecta a la proteína PAT en su capacidad de acetilar L-PPT.

3. Gen *aph4* (*hptI*).

La enzima hygromycin-B phosphotransferase (APH4) codificada por el gen *aph4* de la bacteria *Escherichia coli*, funciona como marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico higromicina B (hygB), inactivándolo mediante la fosforilación del grupo hydroxyl (van den Elzen *et al.*, 1985). La higromicina es un antibiótico aminoglicósido que se une al sitio de unión ribosomal del factor de elongación 2 (EF-2) en las células procariontes. Consecuentemente, la elongación de la cadena de polipéptidos es inhibida y se interrumpe la síntesis de proteínas (Benveniste and Davies, 1973). El gen *aph4* está ampliamente distribuido en la naturaleza y confiere resistencia a un antibiótico que no tiene relevancia en medicina humana y tan sólo se le da un uso restringido en medicina veterinaria.

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

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

El algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614, T304-40 x GHB119 y COT102. No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

1. Evento GHB614.

La estabilidad estructural del evento GHB614 fue demostrada a través de cinco generaciones (T₃, T₄, T₅, T₆ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares, mediante análisis *Southern blot*. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene un sitio de reconocimiento en el T-DNA (Figura 64). El DNA genómico del algodón GHB614 hibridado con la sonda Ph4a748At + intron1 h3At + TPotp C mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados de 4850 bp y 9100 bp en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento GHB614 a nivel genómico (Figura 63 - 67). Adicionalmente, los datos de segregación también confirmaron la estabilidad del evento GHB614 al demostrar que segrega de manera independiente siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante (sección j.2) (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).



Figura 64. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM2 indicando la el sitio de restricción de la enzima *EcoRV* y la posición de la sonda utilizada.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 65. Estabilidad del evento GHB614 generación T₃.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 66. Estabilidad del evento GHB614 generación T₄.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 67. Estabilidad del evento GHB614 generación T₅.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 68. Estabilidad del evento GHB614 generación T₆.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 69. Estabilidad del evento GHB614 generación BC₂F₂.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2. Evento T304-40.

La estabilidad estructural del evento T304-40 fue demostrada a través de cuatro generaciones (F₁, BC₁F₁, BC₂F₁ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares, mediante análisis *Southern blot*. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA (Figura 70). El DNA genómico del algodón T304-40 hibridado con la sonda *cry1Ab* mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento T304-40 a nivel genómico (Figura 69 - 76) (sección j.2) (*INFORMACIÓN CONFIDENCIAL*).

Figura 70. Esquema del T-DNA del plásmido pTDL008 indicando los sitios de restricción de la enzima *EcoRV* y la posición de la sonda utilizada.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Figura 71. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0466 (cultivar 983050 – 99MS88).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 72. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0467 (cultivar Coker 315).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 73. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0468 (cultivar 9740).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 74. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0469 (cultivar 97201-16).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 75. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000740 (generación BC₂F₂).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 76. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000741 (generación BC₂F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 77. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000742 (generación BC₁F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 78. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000743 (generación F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



3. Evento GHB119.

La estabilidad estructural del evento GHB119 fue demostrada a través de tres generaciones (F_1 , BC_1F_1 , BC_2F_1) y en diferentes cultivares, mediante análisis *Southern blot*. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA produciendo dos fragmentos de hibridación (Figura 79). El DNA genómico del algodón GHB119 hibridado con la sonda T-DNA mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento GHB119 a nivel genómico (Figura 78 - 81) (sección j.2) (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

Figura 79. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM12 indicando los sitios de restricción de la enzima *EcoRV* y la posición de la sonda utilizada.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 80. Estabilidad del evento GHB119 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GC03 (cultivar Coker 312).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 81. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación F_1).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 82. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC_1F_1).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 83. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC_2F_1).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

4. Evento COT102.

La estabilidad del evento COT102 fue analizada utilizando plantas de cinco generaciones. Plantas individuales de las generaciones F_1 , BC_1F_2 , BC_2F_1 , BC_2F_2 y BC_3F_1 fueron analizadas para determinar la expresión de la proteína Vip3Aa19 (VIP3/VIP3A) mediante en ensayo cualitativo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA).

Todas las generaciones segregaron como se esperaba para un sitio de inserción único. La progenie F_1 fue producida a partir de una población homocigota y, como se esperaba, todas las plantas expresaron la proteína Vip3Aa19. Las otras cuatro generaciones evaluadas produjeron los resultados esperados con relación a la expresión de la proteína Vip3Aa19. El valor crítico de J_i cuadrada para rechazar la hipótesis nula fue de 3.84 ($p=0.05$) con un grado de libertad



(Strickberger, 1976)²¹. Un valor menor a 3.84 indica que la herencia del gen *vip3Aa19* se comporta siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante. El sitio de inserción permanece estable a través de múltiples generaciones de autopolinización y retrocruzas (Artim *et al.*, 2003) (sección j.2).

El evento **COT102 (SYN-IR102-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutricional y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.

5. Evento GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

La estabilidad de los insertos GHB614, T304-40 y GHB119 fue evaluada en el ADN genómico del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 digerido con la enzima *EcoRV*. Después de la hibridación con las sondas T-DNA y *cry1Ab*, todas las muestras de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 mostraron fragmentos de tamaño comparable a los obtenidos en las líneas parentales GHB614, T304-40, GHB119 y T304-40 x GHB119.

La estabilidad el inserto COT102 fue evaluada a partir de muestras de ADN genómico de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 digerido con las enzimas *BamHI* y *NheI*. Después de la hibridación con las sondas de *vip3Aa19* y *aph4*, todas las muestras de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 mostraron fragmentos de tamaño comparable a los obtenidos en la línea parental COT102, demostrando la estabilidad del evento COT102.

La metodología, análisis *Southern blot* y los resultados que demuestran la estabilidad estructural de los insertos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 son **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados.

- An, A., McDowell, J., Huang, S., McKinney, E., Chambliss, S., & Meagher, R. (1996). Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACTS actin subclass in vegetative tissue. *The Plant Journal*, 10(1), 107-121.
- Aronson, A., & Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 1-8.
- Aronson, A., Beckman, W., & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.*, 50, 1-24.
- Artim, L., Hill, K., Jiang, X., Lee, M., Mascarenhas, V., Mullins, M., . . . Zawodny, J. (2003). *Petition for the determination of non-regulated status: lepidopteran insect protected VIP3A cotton transformation event COT102*. Research Triangle Park, N.C.: Syngenta Seeds, Inc.
- Bartlett, S., Grossman, A., Chua, N., Edelman, M., Hallick, R., & Chua, N. (1982). Methods in chloroplast molecular biology. *Elsevier*.
- Bentley, R. (1990). The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 25(5), 307-384.
- Benveniste, R., & Davies, J. (1973). Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 42, 471-506.

²¹ Los valores mayores al valor crítico se presentarían una vez en veinte oportunidades si la hipótesis es correcta.



- Bevan, M., Barnes, W., & Chilton, M. (1983). Structure and transposition of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research*, 11, 369-385.
- Boevink, P., Chu, P., & Keese, P. (1995). Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: Affinities with the geminiviruses. *Virology*, 207, 254-361.
- Bogosian, G., & Kane, J. (1991). Fate of recombinant Escherichia coli K-12 strains in the environment. En S. Neidleman, & A. (. Laskin, *Advances in Applied Microbiology* (págs. 87–131). San Diego: Academic Press.
- Bolivar, F., Rodrigues, R., Greene, P., Betlach, M., Haymeker, H., Boyer, H., . . . Talkow, S. (1977). Construction and Characterization of New Cloning Vehicles. II. A Multipurpose Cloning System. *Gene*, 2, 95-113.
- Boocock, M., & Coggins, J. (1983). Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Letters*, 154(1), 127-133.
- Bourges, R. (2002). *Alimentos obsequio de México al mundo. La alimentación de los mexicanos*. México, D.F.: El Colegio Nacional.
- Bravo, A., Gill, S., & Soberon, M. (2007). Bravo A., Gill S. S. and Soberon M. (2007). Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S., & Peferoen, M. (1992). Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of Bacillus thuringiensis Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 247-254.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S., & Soberón, M. (2011). Bacillus thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*, 41, 423–431.
- Bulla, L., Kramer, K., & Davidson, L. (1977). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of Bacillus thuringiensis. *J Bacteriol*, 130, 375-383.
- Chabouté, N., & Clement, B. (1987). Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H3 genes of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 8, 179-191.
- Chapman, K., Wu, A., & Gao, Y. (2014). *GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 Cotton-Production and Protein Expression Analyses of Field Samples Grown in the USA during 2013*. Morrisville, N.C.: Bayer CropScience LP. M-500406-01-1.
- 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.
- Chilton, M., Drummond, M., Merlo, D., Sciaky, D., Montoya, A., Gordon, M., & Nester, E. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11, 263-271.
- Chroma, C., & Kaplan, H. (1990). Folding and unfolding of the protoxin from Bacillus thuringiensis: Evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. *Biochemistry*, 29, 10971-10977.
- Cornelissen, M., & Vandewiele, M. (1989). Nuclear transcriptional activity of the tobacco plasmid psbA promoter. *Nucleic Acids Research.*, 17(1), 19-29.
- Cousins, Y., Lyon, B., & Llewellyn, D. (1991). Transformation of an Australian cotton cultivar: prospects for cotton improvement through genetic engineering. *Aust. J. Plant Physiol.*, 18, 481-494.
- De Almeida, E., Gosselé, V., Muller, C., Dockx, J., Reynaerts, A., Botterman, J., . . . Timko, M. (1989). Transgenic expression of two marker genes under the control of an Arabidopsis rbcS promoter: sequence encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Molecular and General Genetics*, 218, 78-86.



- De Beuckeleer, M. (2003). *Description of the amino acid sequence of the double mutant maize 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2m EPSPS)*. Bayer CropScience Internal report. 5 pages. M-234186-01-1.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti pINucleic Acid Research, 13, 4777-4788.*
- Deblaere, R., Reynaerts, A., Hofte, H., Hernalsteens, J., Leemans, J., & van Montagu, M. (1987). Vectors for cloning in plant cells. *Methods in Enzymology, 153, 277-292.*
- Della-Cioppa, G., Bauer, S., Taylor, M., Rochester, D., Klein, B., Shah, D., . . . Kishore, G. (1987). Targeting a herbicide-resistant enzyme from Escherichia coli to chloroplasts of higher plants. *Bio/Technology, 5, 579-584.*
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., & Goodman, H. (1982). Nopaline Synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics, 1, 561-573.*
- Ebersold, H., Geiser, P., & Ettliger, L. (1978). The action of the d-endotoxin of Bacillus thuringiensis: an electron microscope study. *Experientia, 34, 1672.*
- English, L., & Slatin, S. (1992). The mode of action of delta-endotoxins from Bacillus thuringiensis. A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 22, 1-7.*
- Eschenburg, S., Healy, M., Priestman, M., Lushington, G., & Schonbrunn, E. (2002). How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from Escherichia coli. *Planta, 216, 129-135.*
- Estruch, J., Warren, G., Mullins, M., Nye, G., Craig, J., & Koziel, M. (s.f.). Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5389-5394.*
- Forlani, G., Parisi, B., & Nielsen, E. (1994). 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from Zea mays cultured cells. *Plant Physiol., 105, 1107-1114.*
- Frankenhuyzen, V., & Nystrom, C. (2002). *The Bacillus thuringiensis toxin specificity database*. Obtenido de <http://www.glfsc.forestry.ca/bacillus/BtSearch.cfm>
- Fryxell, P. (1979). The origin and spread of the tribe. En *The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae)* (págs. 131-218). College Station, TX: Texas A&M University Press.
- Fryxell, P. (1984). Taxonomy and Germplasm Resources. En R. Kohel, C. Lewis, R. Kohel, & C. F. Lewis (Edits.), *Cotton* (págs. 27-57). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- García Urigüen, P. (2012). *La alimentación de los mexicanos. Cambios sociales y económicos, y su impacto en los hábitos alimenticios*. Mexico, D.F.: CANACINTRA.
- Gringorten, J., Milne, R., Fast, P., Sohi, S., & Frankenhuyzen, V. (1992). Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y K. Van Frankenhuyzen. 1992. Supresion of Bacillus thuringiensis d-endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol., 60, 47-52.*
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). Bacillus thuringiensis CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol., 254, 447-464.*
- Gupta, B., Dow, J., Hall, T., & Harvey, W. (1985). Electron probe X-ray microanalysis of the effects of Bacillus thuringiensis var. kurstaki crystal protein insecticide on ions and electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, Manduca sexta in vitro. *J. Cell Sci., 174, 137-152.*



- Harpster, M., Townsend, J., Jones, J., Bedbrook, J., & Dunsmuir, P. (1988). Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus 1', 2' and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Molecular and General Genetics*, 212, 182-190.
- Herouet-Guicheney, C., Rouquié, D., Freyssinet, M., Currier, T., Martone, A., Zhou, J., . . . Rouan, D. (2009). Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54, 143-153.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., & Van Mellaert, H. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7844-7848.
- Hofte, H., & Whiteley, H. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-255.
- Hooykaas, P., & Schilperoor, R. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19, 15-38.
- Hutchinson, J. (1959). *The application of genetics to cotton improvement*. London: Cambridge Univ. Press.
- Itoh, Y., Watson, J., D., H., & Leisinger, T. (1984). Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid*, 11, 206.
- Kantartzi, S. (2010). Hybridization barriers between cotton (*Gossypium hirsutum*) and species of the Malvaceae family. En B. Kaiser, *Pollen: structure, types and effects* (págs. 305-315). New York: Nova Science Publishers.
- Kaster, K., Burgett, S., Rao, R., & Ingolia, T. (1983). Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nuc. Acids Res.*, 11(19), 6895-6911.
- Kishore, G., & Shah, D. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 627-663.
- Knowles, B., & Dow, J. (1993). The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioessays*, 15, 469-476.
- Knowles, B., Blatt, M., Tester, M., Horsnell, J., Carroll, J., Menestrina, G., & Ellar, D. (1989). A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett*, 244, 259-262.
- Kumar, P., Sharma, R., & Malik, V. (1996). Kumar P. A., Sharma R. P. and Malik V.S. (1996). The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Applied Microbiology*, 42, 1-43.
- Lebrun, M., Leroux, B., & Sailland, A. (1996). *Chimeric gene for the transformation of plants*. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996). RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR).
- Lebrun, M., Sailland, A., & Freyssinet, G. (1997). *Mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene encoding for said protein and transformed plants containing said gene*. International patent publication WO 97/04103-A2. 06.02.97. 25 pages.
- 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).
- Lee, M., Walters, F., Hart, H., Palekar, N., & Chen, J. (2003). The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab δ -Endotoxin. *Appl Environ Microbiol.*, 69(8), 4648-4657.
- Leemans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu, M., & Schell, J. (1982). Broad-host-range cloning vectors derived from the W₊ plasmid Sa. *Gene*, 19, 361-364.
-



- Lemeshev, N. (1978). Algodón. En T. Cervantes, *Recursos Genéticos Disponibles a México* (págs. 385-387). Chapingo, México: Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.
- López-Fuentes, M. (1994). *Los caminos de la fitobacteriología*. Chapingo, México: Univeridad Autónoma Chapingo.
- Marshall, J., Stubbs, J., & Taylor, W. (1996). Two genes encode highly similar chloroplastic NADP-malic enzymes in *Flaveria*. *Plant Physiology*, 111, 1251-1261.
- Meyer, V. (1973). Fertility restorer genes for cytoplasmic male sterility from *Gossypium harknessii*. *Proceedings Beltwide Cotton* (pág. 65). Phoenix, Arizona: Prod. Res. Conf.
- Michiels, F., Morioka, S., Scheirlinck, T., & Komari, T. (1992). *Stamen-specific promoters from rice*. Patent Application WO92/13956A1 (20AUG-1992). PLANT GENETIC SYSTEMS N.V. (BE).
- Milton Poehlman, J., & Sleper, D. A. (1995). *Breeding field crops Fourth Edition*. Iowa State University Press/Ames.
- Murray, E., Lotzer, J., & Eberle, M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucl. Acid Res.*, 17, 477-498.
- Murray, F., Llewellyn, D., MacFadden, H., Last, D., Dennis, E., & Peacock, W. (1999). Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. *Molecular Breeding*, 5, 219-232.
- Norris, S., Meyer, S., & Callis, J. (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*, 21(5), 895-906.
- Odell, J., Nagy, F., & N.H., C. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810-812.
- OECD. (1999). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11*. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. (2002a). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 25. *Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants*. ENV/JM/MONO(2002)14. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. (2007). *Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing Bacillus thuringiensis - Derived Insect Control Protein*. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 42. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Ogiwara, K., Indrasith, L., Asano, S., & Hori, H. (1992). Processing of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 121-126.
- Oka, A., Sugisaki, H., & Takanami, M. (1981). Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *Journal of Molecular Biology*, 147, 217-226.
- Palomo, A. (1996). Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 4, 359-369.
- Rao, V. (2015). *Transgenic Herbicide Resistance in Plants*. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- Ruiz-Corral, J., Medina-García, G., Ortiz-Trejo, C., Martínez-Parra, R., González Acuña, I., Flores-López, H., & Byerly-Murphy, K. (1999). *Requerimientos agroecológicos de cultivos*. Guadalajara, Jal., México.: Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, INIFAP, SAGAR.
- Sacchi, V., Parenti, P., Hanozet, G., Giordana, B., Luthy, P., & Wolfersberger, M. (1986). *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.*(204), 213–218.



- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanfaçon, H., Brodman, P., & Hohn, T. (1991). A dissection of the Cauliflower Mosaic Virus polyadenylation signal. *Genes and Development*, 5, 141-149.
- Scott, A., Van Duyn, G., Freyssinet, M., Poe, M., & Trolinder, L. (2006). *Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol™ cotton Event GHB614 OECD Unique Identifier BCS-GHØØ2-5*. Bayer CropScience USA LP.
- Sikorski, J., & Gruys, K. (1997). Understanding glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: Evidence favoring an allosteric inhibitor model. *Accounts of Chemical Research*, 30, 2-8.
- Soberón, M., & Bravo, A. (2007). *Las toxinas Cry de Bacillus thuringiensis: modo de acción y consecuencias de su aplicación*. Cuernavaca, Mor.: Instituto de Biotecnología-UNAM.
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., & Eguiarte, L. (2001). Ecología evolutiva de Escherichia coli. *INCI*, 26(10), 513-517.
- Steinrücken, H., & 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.
- Stewart, J. (1995). Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. En C. Git, & N. Forrester, *Proc. World Cotton Research Conference* (págs. 313-327). Melbourne: CSIRO.
- Strickberger, & M.W. (1976). *Genetics, 2nd Ed. Chapter 8. Probability and Statistical Testing*. New York: Macmillan Publishing Co., Inc.
- Talipov, F., Salgado, U., Catalan, H., Domínguez, M., & Bahena, L. (1995). *El cultivo del algodón y su mejoramiento genético en el estado de Guerrero*. Universidad Autónoma de Guerrero: Dirección de Investigación Científica.
- Tempé, J., Petit, A., Holsters, M., Montagu, M., & Schell, J. (1977). Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *Tempé J, Petit A, Holsters M, Montagu M, Schell J. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: PProc Natl Acad Sci USA, Tempé J, Petit A, Holsters M, Montagu M, Schell J. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Pos74(7)*, Tempé J, Petit A, Holsters M, Montagu M, Schell J. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during co2848-2849.
- Thompson, C., Movva, N., Tichard, R., Cramer, R., Davies, J., & Lauwereys, M. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus. *EMBO J.*, 6, 2519-2523.
- Tinland, B., & Hohn, B. (1995). Recombination between Prokaryotic and Eukaryotic DNA: Integration of Agrobacterium tumefaciens T-DNA into the plant genome. *Genetic Engineering*, 17, 209-229.
- Tojo, A., & Aizawa, K. (1983). Dissolution and degradation of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm Bombyx mori. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 576-580.
- Trolinder, N., & Goodin, J. (1988a). Somatic Embryogenesis in Cotton (Gossypium): I. Effects of Source of Explant and Hormone Regime. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 31-42.
- Trolinder, N., & Goodin, J. (1988b). Somatic Embryogenesis in Cotton (Gossypium): II. Requirements for Embryo Development and Plant Regeneration. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 43-53.
- Ulloa, M., Stewart, J., Garcia, E., Godoy, A., Gaytan, M., & Acosta, N. (2006). Cotton genetics resources in the western states of Mexico: in situ conservation status and germplasm collection for ex situ preservation. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 53 653-668.



- Vadlamudi, R., Weber, E., Ji, I., Ji, T., & Bulla, L. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270, 5490–5494.
- Van Den Elzen PJM, T. J. (1985). A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.*, 5, 299-302.
- Van der Klis, R., & De Pestel, K. (2006). *2mEPSPS protein contents in leaf, stem, root, square, apex and pollen tissues during the life cycle of the glyphosate tolerant cotton event GHB614*. Belgium: Bayer BioScience N.V. Belgium. M-280254-01-1.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., & Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur J Biochem*, 186, 239-247.
- Van Rie, j., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., & Van Mellaert, H. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1378-1385.
- Verdaguer, B., De Kochko, A., Beachy, R., & Fauquet, C. (1996). Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*, 31, 1129-1139.
- Verdaguer, B., de Kochko, A., Fux, C., Beachy, R., & Fauquet, C. (1998). Functional organization of the cassava mosaic virus (CsVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*, 37, 1055-1067.
- Waldron, C. (1997). United States Patent No. 5,668,298. Selectable marker for development of vectors and transformation systems in plants.
- Walsh, C., Benson, T., Kim, D., & Lees, W. (1996). The versatility of phosphoenolpyruvate and its vinyl ether products in biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 3, 93-91.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., & Schulz, A. (1996). The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*, 14, 1274-1278.
- Wendel, J., Brubaker, C., & Seelanan, T. (2010). The origin and evolution of *Gossypium*. En J. Stewart, D. Oosterhuis, J. Heitholt, & J. Mauney, *Physiology of cotton* (págs. 1-18). New York: Springer.
- Wolfersberger, M., Hofmann, C., & Luthy, P. (1986). Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. En P. Falmagne, J. Alouf, J. Fehrenbach, J. Jeljaszewics, & M. Thelestam, *Bacterial Protein Toxins*. New York: Gustav Fischer.
- Zambryski, P. (1988). Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Ann. Rev. Genet.*, 22, 1-30.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N., Taussig, R., & Bulla, L. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academies of Science (U.S.A.)*, 103(26), 9897-9902.
- Zhou, M., Xu, H., Wei, X., Ye, Z., Wei, L., Gong, W., . . . Zhu, Z. (2006). Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. *Plant Physiology*, 140, 184-195.



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.

El algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus (BCS-GH002-5 x BCS-GH004-7 x BCS-GH005-8 x SYN-IR102-7) será importado y/o movilizado en forma de semilla. En el Cuadro 34 se indica la cantidad de semilla que será importada y/o movilizada, así como las fechas propuestas de importación y/o movilización.

Cuadro 34. Superficie y cantidad de semilla a importar y/o movilizar para el programa experimental de algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus durante el ciclo PV-2016.

Ciclo	Periodo de importación de la semilla	Periodo de siembra	Superficie (ha)	Densidad de siembra (kg)	Cantidad de semilla requerida (kg)
PV-2016	Marzo de 2016	Mayo – Junio de 2016	5	17	85

La semilla importada será liberada en los sitios experimentales ubicados dentro de los polígonos de Chihuahua, Coahuila y Durango, así como en el polígono de Tamaulipas Sur. En la Figura 82 - 83 se puede apreciar geográficamente los polígonos propuestos para la liberación en etapa experimental del algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus durante el ciclo PV-2016.

Figura 84. Polígono propuesto para la liberación de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus en etapa experimental en la región agrícola de Chihuahua, Coahuila y Durango.

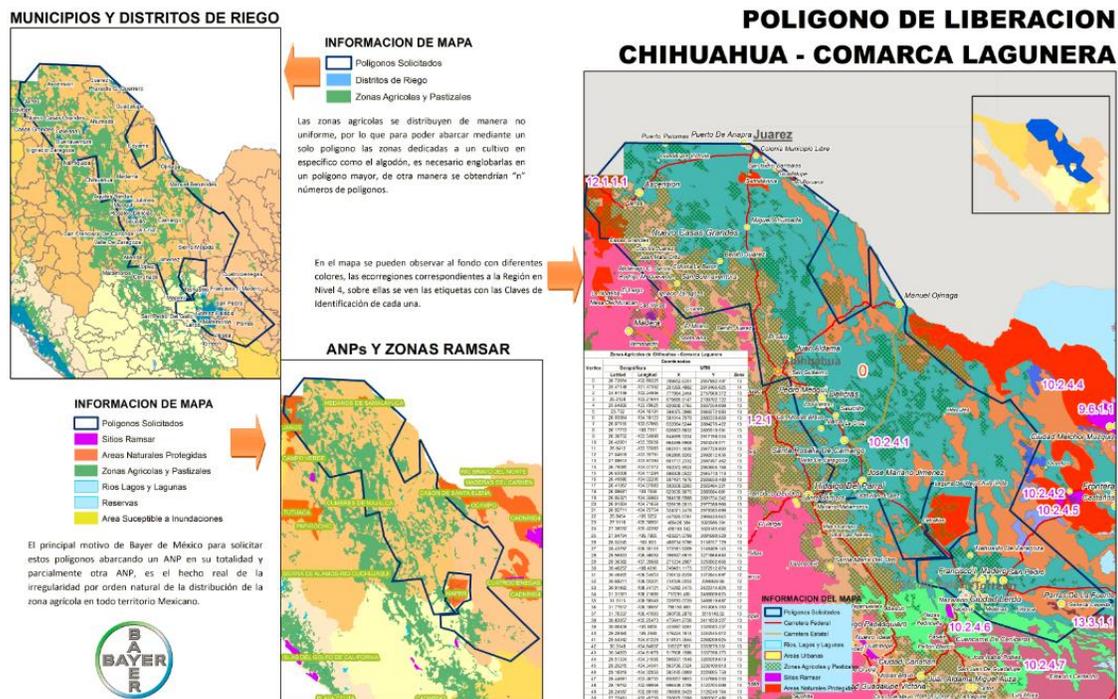
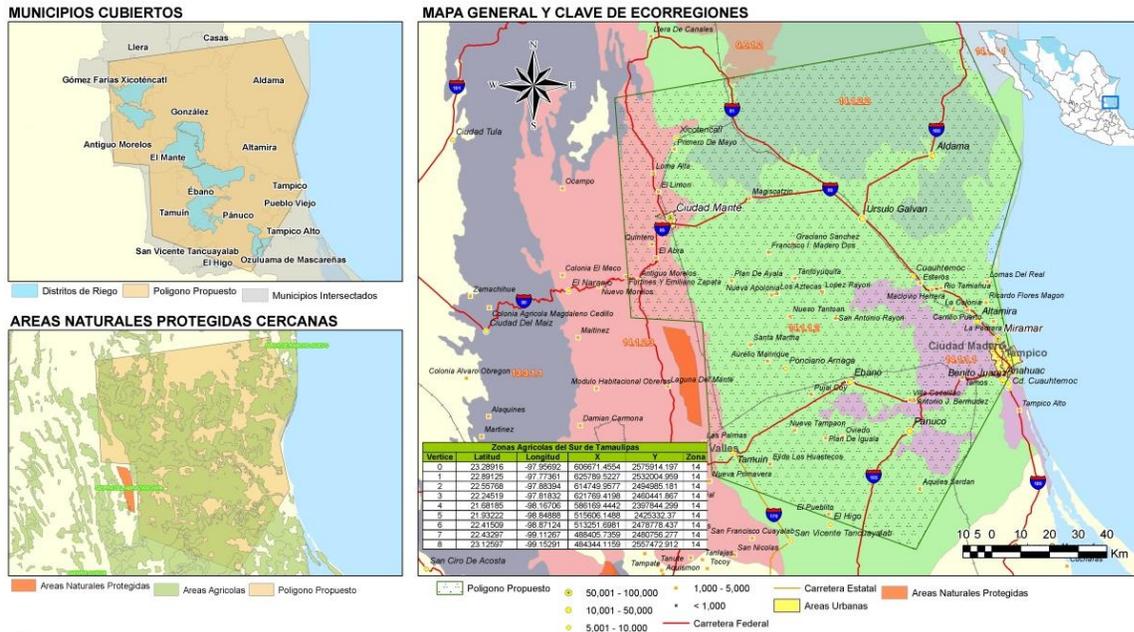


Figura 85. Polígono propuesto para la liberación de algodón GlyToI® TwinLink™ Plus en etapa experimental en la región agrícola de Tamaulipas Sur.

ANEXO: POLIGONO DE LIBERACION PROPUESTO PARA SUR DE TAMAULIPAS



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

Los sitios donde se pretende realizar las liberaciones del algodón GlyToI® TwinLink™ Plus (GLTC) están ubicados dentro de los polígonos cuyos vértices se presentan en los Cuadro 35 – 36.

Cuadro 35. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyToI® TwinLink™ Plus en etapa experimental en Chihuahua y Comarca Lagunera.

Zonas agrícolas de Chihuahua - Comarca Lagunera					
Vértice	Coordenadas geográficas		Coordenadas UTM		
	Latitud	Longitud	X	Y	Zona
0	26.72654	-102.89225	709652.6351	2957882.407	13
1	25.47148	-101.47392	251269.4882	2819466.025	14
2	24.91158	-102.24906	777864.2454	2757968.372	13
3	25.2128	-103.21644	679685.9147	2789702.722	13
4	25.64806	-103.79625	620830.7765	2837259.099	13
5	25.732	-104.16181	584075.3986	2846272.083	13
6	26.03964	-104.18123	581914.7979	2880330.669	13
7	26.07155	-103.67965	632064.6244	2884276.422	13
8	26.17713	-103.7311	626803.8832	2895919.591	13
9	26.36752	-103.54998	644669.5224	2917198.524	13
10	26.42901	-103.35039	664498.6908	2924249.571	13



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de Algodón GlyToI™ TwinLink™ Plus (GLTC) en etapa experimental, ciclo PV-2016

11	26.6412	-103.37083	662161.4036	2947729.803	13
12	27.04619	-103.35791	662866.8202	2992612.636	13
13	27.09613	-103.97394	601717.2332	2997497.462	13
14	26.79085	-104.07372	592072.8524	2963605.768	13
15	26.63008	-104.11284	588308.0522	2945770.719	13
16	26.45686	-104.02206	597491.1676	2926650.489	13
17	26.41957	-104.07083	592658.8285	2922484.221	13
18	26.08681	-103.7638	623630.8675	2885884.081	13
19	26.05321	-104.35863	564158.6988	2881734.242	13
20	26.91804	-104.71659	528139.0015	2977388.966	13
21	26.92711	-104.75754	524071.2478	2978385.099	13
22	26.8454	-105.5252	447820.6781	2969420.045	13
23	27.3116	-105.30901	469426.384	3020986.391	13
24	27.38532	-105.42282	458193.542	3029185.092	13
25	27.94794	-105.7805	423221.0798	3091680.529	13
26	28.55245	-105.933	408734.9796	3158757.729	13
27	28.43797	-106.30116	372581.6209	3146409.145	13
28	29.56833	-106.48039	356597.6815	3271868.683	13
29	29.36382	-107.35668	271234.2067	3250602.666	13
30	30.46257	-108.4016	749481.1173	3372912.874	12
31	30.46465	-108.54053	736132.8358	3372844.697	12
32	30.68211	-108.55201	734506.0552	3396929.88	12
33	30.91462	-108.74721	715282.7473	3422314.824	12
34	31.31361	-108.71666	717291.485	3466609.625	12
35	31.3113	-108.58549	729783.0729	3466619.687	12
36	31.77617	-108.18957	766150.883	3519065.353	12
37	31.76337	-106.47093	360700.2878	3515148.92	13
38	30.83957	-105.25473	475641.2756	3411850.227	13
39	30.06409	-105.6858	433897.9281	3326085.257	13
40	29.29365	-105.2448	476224.1614	3240545.072	13
41	29.54342	-104.81224	518191.3555	3268209.025	13
42	30.3148	-104.84057	515327.901	3353679.331	13
43	30.34833	-104.81679	517608.1586	3357398.375	13
44	29.51334	-104.31036	566837.1548	3265059.619	13
45	29.25215	-104.34341	563796.7324	3236100.818	13
46	29.16819	-104.32956	565195.6069	3226805.758	13
47	28.44691	-103.46755	650057.9855	3147666.533	13
48	28.19752	-102.99958	696348.7706	3120703.008	13
49	28.24587	-102.89166	706850.8429	3126240.764	13
50	27.72481	-102.45739	750675.0398	3069307.486	13



Cuadro 36. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus en etapa experimental en Tamaulipas Sur.

Zonas agrícolas de Tamaulipas Sur					
Vértice	Coordenadas geográficas		Coordenadas UTM		
	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

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

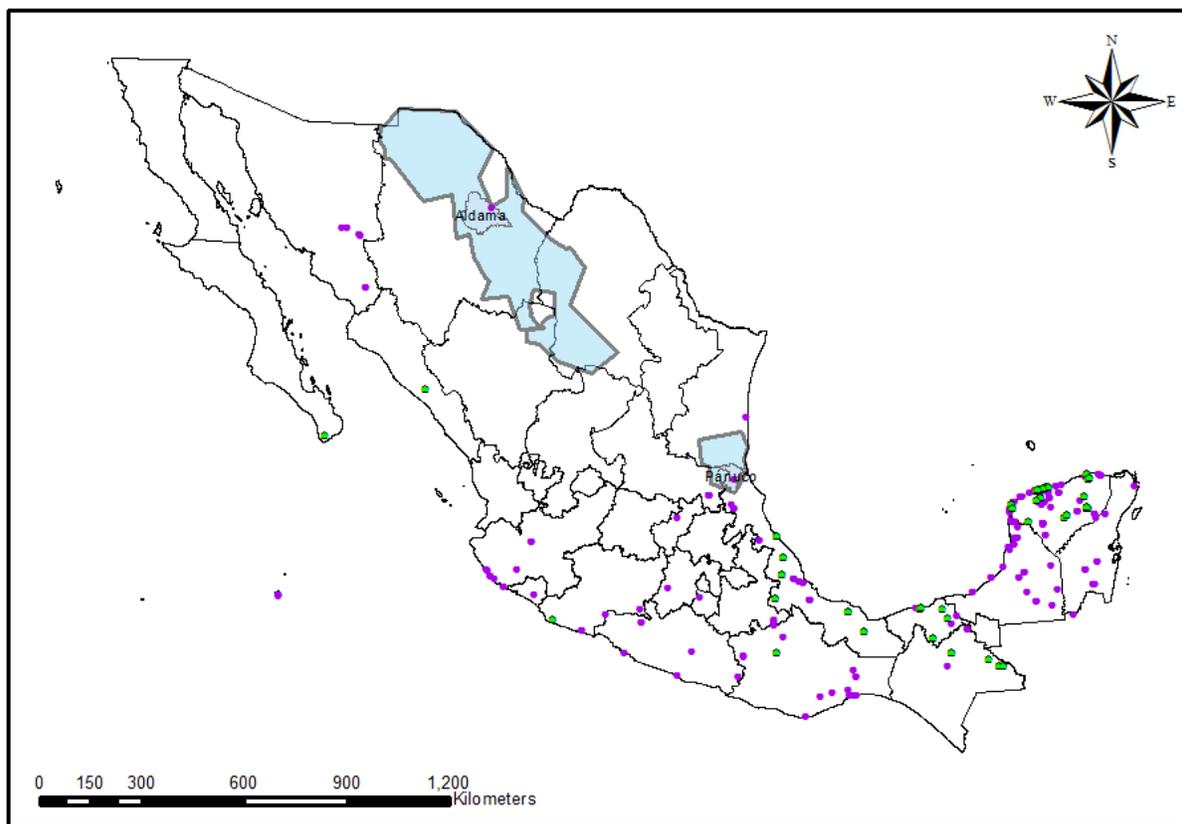
1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos.

No existen especies sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*Gossypium hirsutum*) en el área de liberación propuesta. De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), se reportan ocho especies de *Gossypium* para la región Norte de México (Cuadro 37). Adicionalmente, la CONABIO reporta únicamente un registro de *Gossypium hirsutum* en 1972 en el municipio de Aldama, Chih., el cual se localiza a varios kilómetros de las zonas donde se cultiva algodón como para que llegara a existir flujo genético. Para el caso del polígono de Tamaulipas Sur, el sitio de colecta disponible más cercano se encuentra a 142 km de las principales zonas agrícolas de la región (Figura 86).

Cuadro 37. Especies de *Gossypium* reportadas en la literatura para el Norte de México.

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

Figura 86. Distribución puntual de *G. hirsutum* y *G. barbadense* con relación al polígono de liberación propuesto para la liberación de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus.



- Gossypium_barbadense
- Gossypium_hirsutum

Las especies silvestres reportadas para México son diploides ($2n=2x=26$) y, por lo tanto, son sexualmente incompatibles con el algodón cultivado *G. hirsutum* el cual es una especie alotetraploide ($2n=4x=52$). En el caso de que se pudieran encontrar especies silvestres cercanas a las regiones agrícolas y en el improbable caso de que pudieran quedar en contacto con polen de *G. hirsutum* (tetraploide), el producto de la fecundación sería triploide y durante la metafase de la meiosis no se podría realizar el apareamiento de cromosomas homólogos, imposibilitando así la formación de un cigoto fértil por la disparidad de los sistemas genéticos (Stewart, 1995; Wendel *et al.*, 2010; Kantartzi, 2010). A esta barrera genética se debe incluir la barrera temporal para el entrecruzamiento ya que no se presenta coincidencia en los períodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales. Por otra parte, la distribución de la especie alotetraploide *G. barbadense* se encuentra limitada principalmente al sureste de México lejos de las zonas productoras de algodón comercial en el norte de la República Mexicana. A continuación se describen las especies de *Gossypium* originarias de México que han sido reportadas en la literatura (Fryxell, 1984; Palomo, 1996):

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



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

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

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

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

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

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



cosecha más limpia y de mejor calidad (libre de residuos de hojas). Habita en las selvas bajas caducifolias, en pendientes con suelos delgados, arenosos, pedregosos y pobres.

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

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

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

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

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

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

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

En adición a las especies diploides endémicas de México mencionadas anteriormente, se reporta la presencia de la especie tetraploide de origen Peruano **G. barbadense**. Esta especie es un arbusto o subarbusto anual que no tiene mucha importancia comercial en México y de acuerdo con



información de la CONABIO²², se tienen registros para los Estados de Baja California Sur, Sinaloa, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán (www.conabio.gob.mx).

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

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

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

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

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

G. hirsutum yucatanense, es originaria de la Costa norte de Yucatán, es una planta rastrera con flor de color amarillo y fibra de color café.

G. hirsutum punctatum, se le encuentra en los Estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo. Tiene bellotas de redondas a ovales y de diferente tamaño. Poseen fibra larga, de color café o blanco. La longitud de la fibra varía de los 24 mm a los 29.2 mm.

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

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a todas las especies de *Gossypium* que no se requiere repetir para cada taxón. Todas las especies de *Gossypium* presentan autopolinización aunque pueden presentarse ciertos cruzamientos intra específicos y posiblemente inter específicos mediados por insectos. El transporte del polen por el viento en el género *Gossypium* nunca se ha reportado lo cual es explicado por la textura y consistencia del polen producido en antesis. El polen

²² Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.



de *G. hirsutum* es viable por no más de 24 horas. Cada flor, como las todos los miembros de Malvaceae, son receptivas únicamente el día en que abren.

El algodón es una planta dioica que se reproduce predominantemente mediante autopolinización. Las flores del algodonoero son bisexuales; nacen en las axilas foliares a lo largo de las ramas fructíferas. Cada rama puede producir hasta 10 botones. Cada flor está compuesta por un cáliz tubular, ligeramente pentalobulado, corola de cinco grandes pétalos que son de color blanco cremoso por las mañanas, color que cambia gradualmente a púrpura, después de ser fecundada.

El gineceo está formado por un ovario súpero, con tres a cinco carpelos unidos cada uno con dos a siete óvulos; el estilo termina en un estigma lobulado. El androceo es un tubo corto que se inicia en la base del gineceo envolviéndolo, dando origen - en toda su longitud -, a estambres filamentosos que terminan en anteras bilobuladas. Cada botón floral está protegido por tres a cinco brácteas triangulares formando lo que se conoce comúnmente como cuadros. Las brácteas persisten hasta la maduración del fruto.

Un día antes de la antesis emerge la corola de los cuadros, en el día de la antesis la corola abre y ocurre la liberación de polen. La corola se torna de color rojo un día después de la antesis y más tarde se cae de la planta. La polinización ocurre cuando las anteras abren y liberan el polen en el estigma; ocasionalmente el polen es depositado en el estigma por insectos polinizadores. El algodón es una planta que se reproduce predominantemente mediante autopolinización, sin embargo se puede presentar de un 5 a 30% de polinización cruzada cuando existen poblaciones importantes de insectos. Los abejorros (*Bombus* spp.) y las abejas (*Apis mellifera*) son los polinizadores primarios (McGregor, 1976). La concentración de insectos polinizadores varía entre las diferentes localidades y estaciones del año y son suprimidas significativamente por el uso de insecticidas. La polinización mediante el viento es muy poco probable debido a que el polen es pesado y pegajoso y no puede ser transportado a grandes distancias. De acuerdo con Fryxell (1979) la especie *Gossypium tomentosum* parece ser polinizada por lepidópteros, probablemente por una palomilla, debido a que el estigma en *G. tomentosum* es elongado y por esta condición la planta es incapaz de autopolinizarse. Las flores también son atípicas debido a que abren durante la noche. Las flores de la mayoría de las especies de *Gossypium* son efímeras, abren en la mañana y se marchitan al atardecer del mismo día.

Aun cuando estén presentes altas poblaciones de insectos, el transporte del polen disminuye significativamente al incrementarse la distancia. En un experimento reportado por McGregor (1976) en el cual un campo de algodón rodeado por un gran número de colonias de abejas y el movimiento de polen fue marcado mediante partículas fluorescentes, se encontró que a una distancia de 45 a 60 m únicamente 1.6% de las flores mostró la presencia de partículas fluorescentes. Otro estudio reportado por Umbeck *et al.* (1991) realizado en el Estado de Mississippi, USA en el que se utilizó el gen marcador de resistencia a la kanamicina y que considero la distancia y orientación de las parcelas, así como la variación estacional de producción de semilla (muestras tomadas de la parte inferior, media y superior de la planta de algodón), muestra que el movimiento de polen en el cultivo del algodón disminuye significativamente después de los 12 m. La distancia de aislamiento recomendada para la producción de semilla de algodón tipo Fundación, Registrada y Certificada establecida en Estados Unidos es de 400 m, 400 m y 200 m respectivamente (e-CFR Title 7 Part 201).

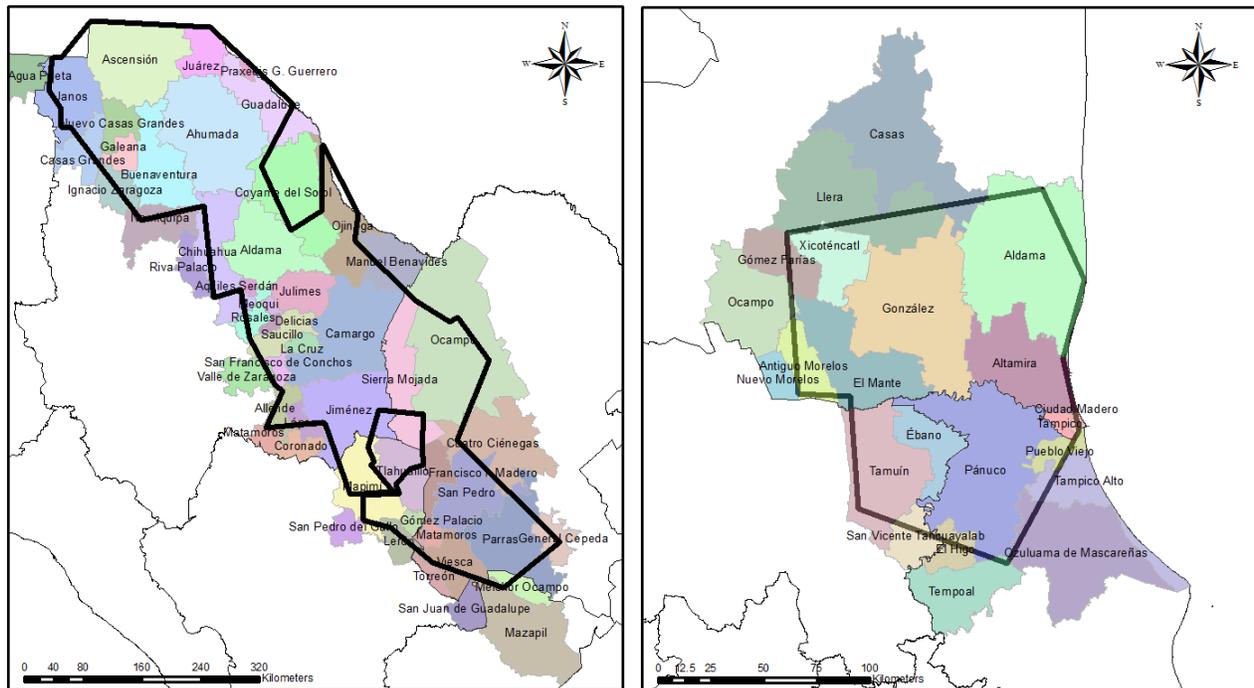


2. Descripción geográfica.

2.1. Municipios.

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en las regiones algodoneras de Chihuahua, Coahuila y Durango, así como en la región Sur del Estado de Tamaulipas. Los municipios comprendidos son: Ahumada, Aldama, Allende, Aquiles Serdán, Ascensión, Buenaventura, Camargo, Casas Grandes, Coronado, Coyame del Sotol, La Cruz, Chihuahua, Delicias, Galeana, Guadalupe, Ignacio Zaragoza, Janos, Jiménez, Juárez, Julimes, López, Manuel Benavidez, Matamoros, Meoqui, Namiqipa, Nuevo Casas Grandes, Ojinaga, Praxedis G. Guerrero, Riva Palacio, Rosales, San Francisco De Conchos, Saucillo, Valle de Zaragoza (Chihuahua), Cuatrociénegas, Francisco I. Madero, General Cepeda, Matamoros, Ocampo, Parras, San Pedro, Sierra Mojada, Torreón, Viesca (Coahuila), Gómez Palacio, Lerdo, Mapimí, San Juan de Guadalupe, San Pedro del Gallo, Tlahualilo, Melchor Ocampo, Mazapil (Durango), Gómez Farías, Xicoténcatl, Llera, Aldama, González, El Mante, Ocampo, Altamira, Casas, Antiguo Morelos, Tampico, Ciudad Madero, Nuevo Morelos (Tamaulipas), Ébano, San Vicente Tancuayalab y Tamuín (San Luis Potosí), Pánuco, Pueblo Viejo, Tampico Alto, Ozuluama de Mascareñas, Temporal y El higo (Veracruz) (Figura 87).

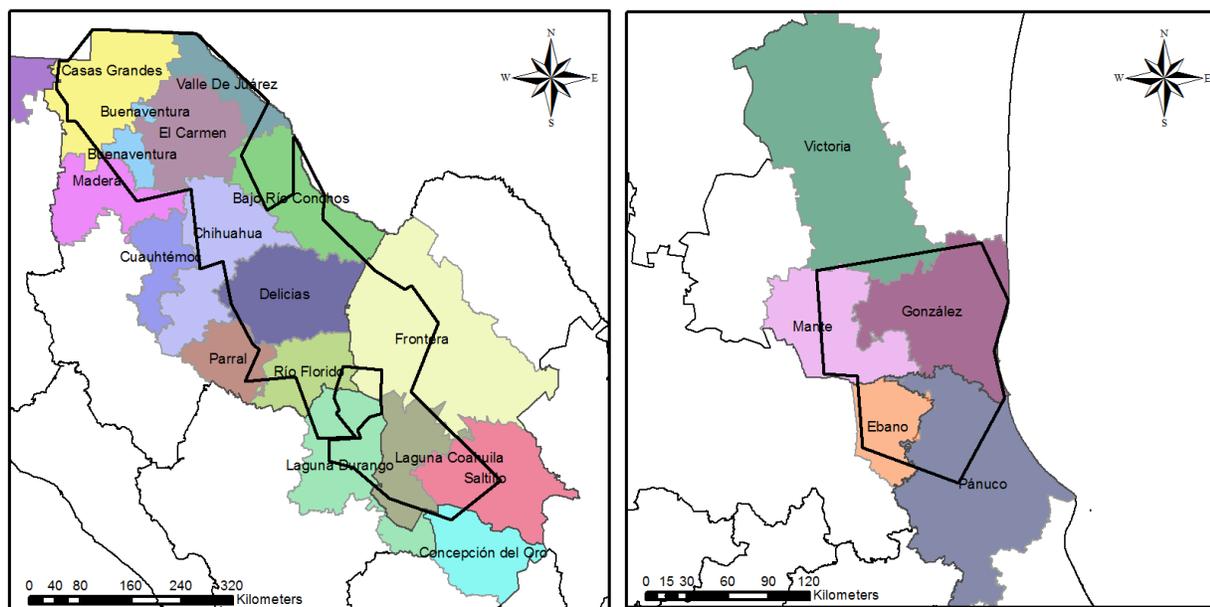
Figura 87. Municipios comprendidos dentro de los polígonos de liberación de algodón GlyToI™ TwinLink™ Plus.



2.2. Distritos de Desarrollo Rural (DDR).

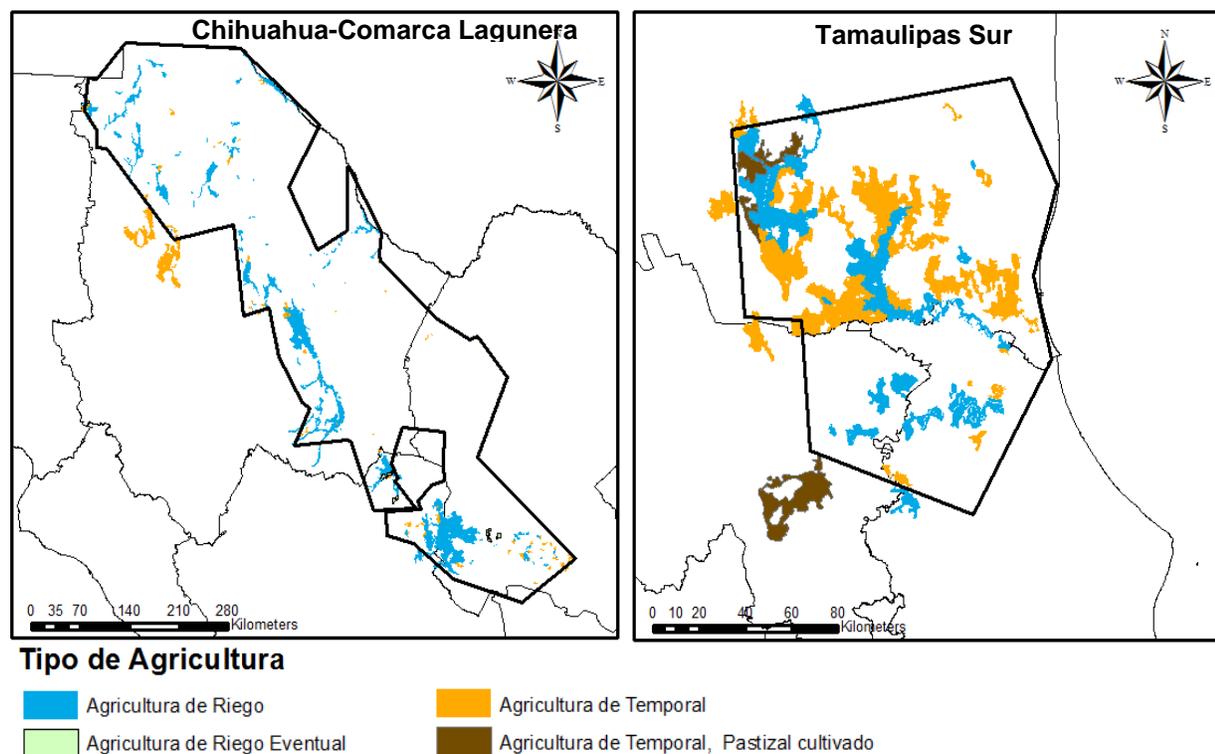
Los polígonos propuestos para la liberación de algodón GLTC abarcan los Distritos de Desarrollo Rural (DDR) Cuauhtémoc, Chihuahua, Valle de Juárez, Casas Grandes, Buenaventura, Madera, Delicias, El Carmen, Bajo Río Conchos, Río Florido, Parral, Frontera, Laguna Coahuila, Laguna Durango, Concepción del Oro (Polígono Chihuahua-Comarca Lagunera); Victoria, González, Mante, Panuco y Ébano (Polígono Tamaulipas Sur) (Figura 88).

Figura 88. Distritos de Desarrollo Rural (DDR) comprendidos dentro de los polígonos de liberación de algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus.



Dentro de los polígonos propuestos para realizar la liberación existen diferentes tipos de agricultura, predominando en el polígono de Chihuahua-Comarca Lagunera una agricultura de riego, mientras que para el polígono de Tamaulipas Sur la actividad agrícola más importante se desarrolla con agricultura de temporal (Figura 89).

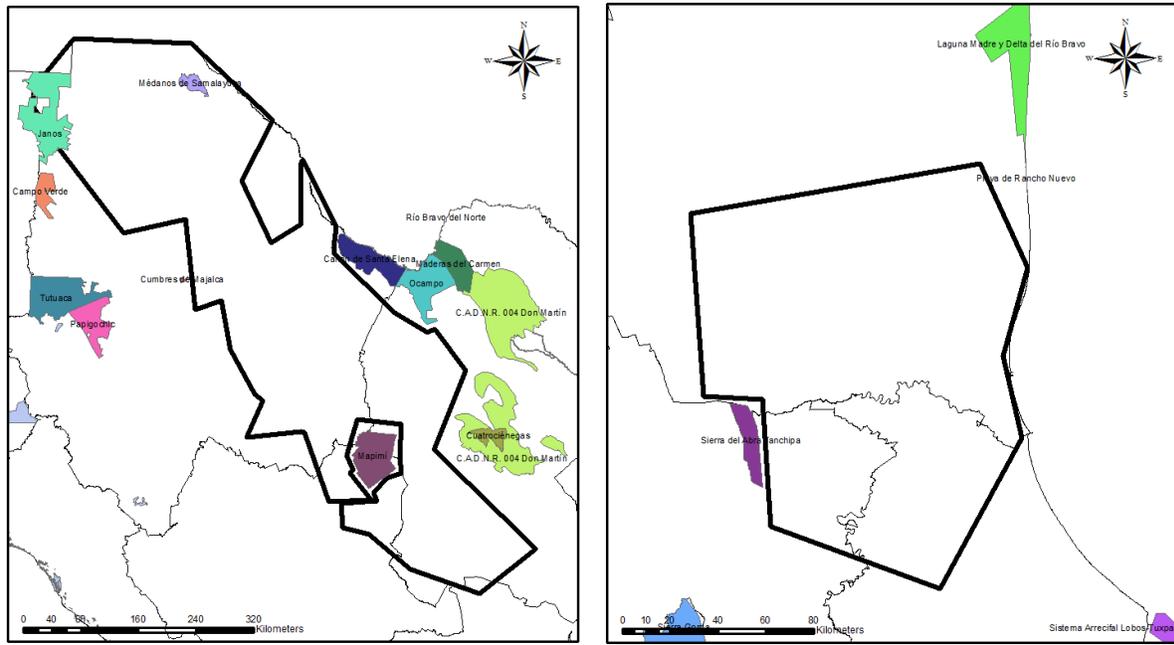
Figura 89. Tipo de agricultura en los polígonos de liberación propuestos.



2.3. Áreas Naturales Protegidas (ANP).

La liberación del algodón GlyTol® TwinLink™ Plus se hará exclusivamente dentro de los polígonos especificados en la solicitud, los cuales se encuentran a una distancia considerable de las Áreas Naturales Protegidas: Janos, Médanos de Samalayuca, Campo Verde, Cumbres de Majalca, Cañón de Santa Elena, Ocampo, Maderas del Carmen, CADNR004, Mapimí, Cuatrociénegas, Laguna Madre, Delta del Río Bravo, Santuario Playa de Rancho Nuevo y Reserva de la Biosfera Sierra del Abra Tanchipa. (Figura 90); 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. establecerá los controles y cumplirá con las medidas de bioseguridad necesarios para que la liberación de algodón genéticamente modificado no se realice en las zonas núcleo de las Áreas Naturales Protegidas anteriormente mencionadas y a menos de 1 km de las mismas.

Figura 90. Áreas Naturales Protegidas aledañas a los polígonos de liberación.

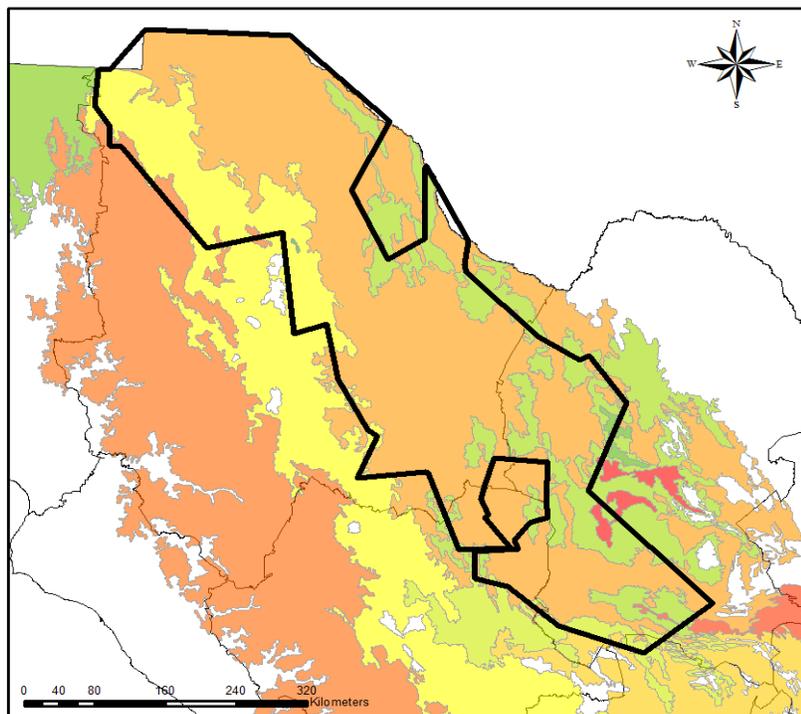


2.4. Ecorregiones nivel IV.

Dentro del polígono de liberación que se encuentra en los Estados de Chihuahua, Coahuila y Durango, se localizan las siguientes ecorregiones Nivel IV (Figura 91):

- Lomeríos y planicies con matorral xerófilo, pastizal y bosques de encinos y coníferas.
- Lomeríos y sierras bajas del Desierto Chihuahuense Norte con matorral xerófilo micrófilo-rosetófilo.
- Lomeríos y sierras bajas del Desierto Chihuahuense Sur con matorral xerófilo micrófilo-rosetófilo.
- Piedemontes y Planicies con Pastizal, matorral xerófilo y bosques de encinos y coníferas.
- Planicies del Altiplano Zacatecano Potosino con matorral xerófilo micrófilo-crasicaule.
- Planicies del centro del Desierto Chihuahuense con vegetación xerófila micrófila-halófila.
- Sierra con bosques de coníferas, encinos y mixtos.
- Sierra con bosques de encinos, coníferas y mixtos.
- Valles endorreicos de Cuatrociénegas con vegetación xerófila micrófila-halófila-gipsófila.

Figura 91. Ecorregiones Nivel IV presentes dentro del polígono de liberación Chihuahua-Coahuila y Durango.



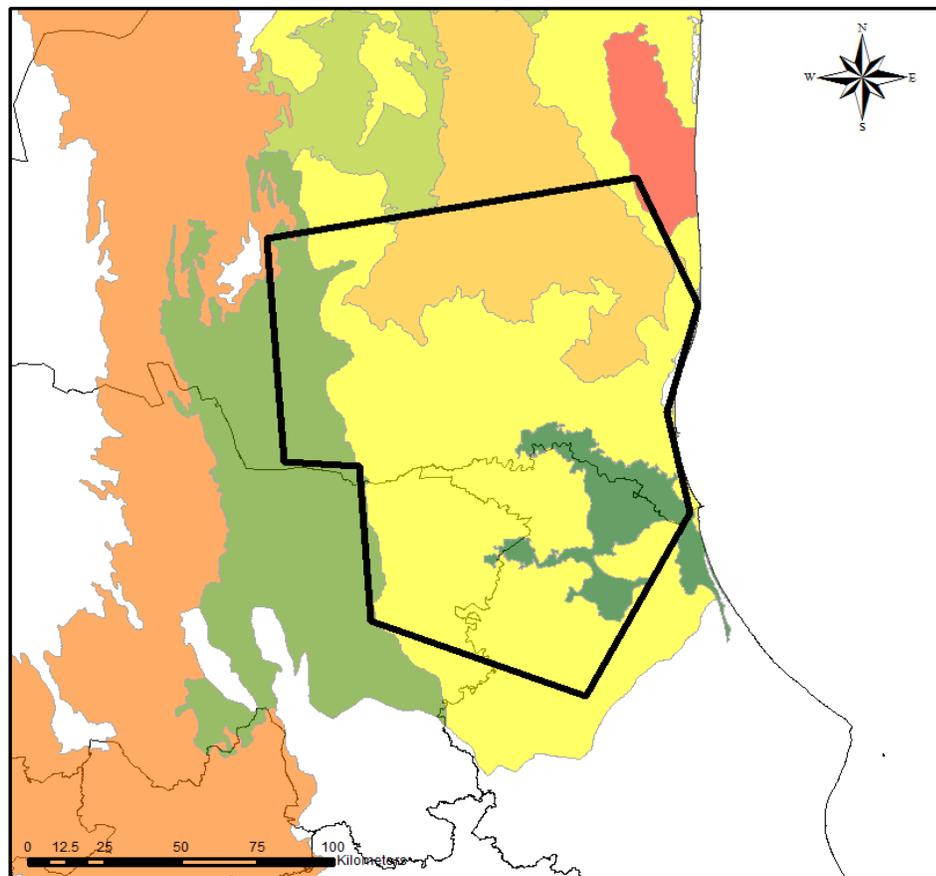
Ecorregiones Polígono Chihuahua-Coahuila-Durango

- Elevaciones mayores del Desierto Chihuahuense con vegetación xerófila, bosques de coníferas, de encinos y mixtos
- Lomeríos y Planicies con matorral xerófilo, pastizal y elevaciones aisladas con bosques de encinos y coníferas
- Lomeríos y sierras bajas del Desierto Chihuahuense Norte con matorral xerófilo microfilo-rosetofo
- Lomeríos y sierras bajas del Desierto Chihuahuense Sur con matorral xerófilo microfilo-rosetofo
- Piedemontes y Planicies con pastizal, matorral xerófilo y bosques de encinos y coníferas
- Planicies del Altiplano Zacatecano-Potosino con matorral xerófilo microfilo-crasicaule
- Planicies del centro del Desierto Chihuahuense con vegetación xerófila microfilo-halofila
- Sierra con bosques de coníferas, encinos y mixtos
- Sierra con bosques de encinos, coníferas y mixtos
- Valles endorreicos de Cuatro Ciénegas con vegetación xerófila microfilo-halofila-gipsofila

Dentro del polígono de liberación que se encuentra en los estados de Tamaulipas, Veracruz y San Luis Potosí, se localizan las siguientes ecorregiones Nivel IV (Figura 92):

- Humedales del Pánuco.
- Lomeríos y planicies con selva baja caducifolia (de la Sierra de Cucharas).
- Lomeríos y sierras con matorral Xerófilo y Bosques de encino
- Planicie costera con selva baja espinosa, Selva baja caducifolia y bosques de encino de la Sierra de Dientes de Moreno
- Sierra con bosques de encinos, coníferas y mixtos.
- Sierra de Maratines con selva mediana caducifolia.

Figura 92. Ecorregiones Nivel IV presentes dentro del polígono de liberación Tamaulipas Sur.



Ecorregiones Polígono Tamaulipas Sur

-  Humedales del Panuco
-  Lomerios y Planicies con selva baja caducifolia (de la Sierra de Cucharas)
-  Lomerios y Sierras con matorral xerofilo y bosques de encino
-  Planicie Costera con selva baja espinosa
-  Selva baja caducifolia y bosque de encino de la Sierra de Dientes de Moreno
-  Sierra con bosques de encinos, coníferas y mixtos
-  Sierra de Maratines con selva mediana caducifolia

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

En los los mapas de la SCT de las carreteras y caminos de los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango y Tamaulipas, se puede observar con mayor detalle la ruta de transporte de la semilla y las posibles rutas alternas, en caso de que se presente algún imprevisto. Asimismo, se describen los polígonos en los que se llevará a cabo la liberación. En el mapa principal de dichos anexos, se pueden observar en líneas rojas y naranjas las carreteras federales y estatales –respectivamente– que cruzan el polígono.

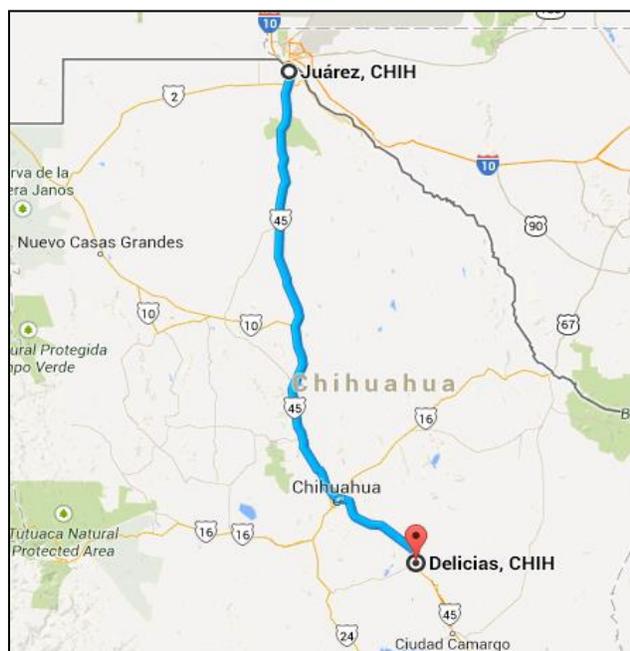


En el plano de ubicación de la ruta de movilización (Figura 93), se muestra que la movilización será por tierra a partir del origen de la semilla en los Estados Unidos de América. Posteriormente entrará a México a través de una aduana en Cd. Juárez, Chih. o Nuevo Laredo, Tams.; en caso necesario y sólo para hacer más eficiente la importación 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:

Almacén Delicias

Km 3 Carr. Panamericana Sur
S/N Sector Oriente
33019 Cd. Delicias, Chihuahua.

Figura 93. Ruta de movilización de Cd. Juárez a Delicias, Chih.



Origen: Cd. Juárez, Chih.

Coordenadas geográficas: 28.18260 N, -105.44907 W

Destino: Delicias, Chihuahua

Carreteras: Mex 045 y 045 D

Distancia: 436 km

Puntos intermedios: Cd. Juárez - Ahumada 117 km, Ahumada - El Sueco 86.7 km, El Sueco - Sacramento 126 km, Sacramento - Chihuahua 21.8 km y Chihuahua - Delicias 85 km

De esta ubicación el material será trasladado por tierra a los sitios donde se realice la evaluación en las regiones de Chihuahua, Coahuila, Durango y Tamaulipas.



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.

El algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614, T304-40 x GHB119 y COT102. No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

El estudio de estabilidad molecular mediante PCR y el análisis de los datos de segregación, permitieron concluir que los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 segregan de manera independiente siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante.

1. Evento GHB614.

La estabilidad estructural del evento GHB614 fue demostrada a través de cinco generaciones (T₃, T₄, T₅, T₆ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares, mediante análisis *Southern blot*. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene un sitio de reconocimiento en el T-DNA (Figura 94). El DNA genómico del algodón GHB614 hibridado con la sonda Ph4a748At + intron1 h3At + TPotp C mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados de 4850 bp y 9100 bp en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento GHB614 a nivel genómico (Figura 95 - 99). Adicionalmente, los datos de segregación también confirmaron la estabilidad del evento GHB614 al demostrar que segrega de manera independiente siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante (sección I.j.2) **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

Figura 94. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM2 indicando la el sitio de restricción de la enzima *EcoRV* y la posición de la sonda utilizada.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 95. Estabilidad del evento GHB614 generación T₃.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 96. Estabilidad del evento GHB614 generación T₄.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 97. Estabilidad del evento GHB614 generación T₅.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Figura 98. Estabilidad del evento GHB614 generación T₆.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 99. Estabilidad del evento GHB614 generación BC₂F₂.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2. Evento T304-40.

La estabilidad estructural del evento T304-40 fue demostrada a través de cuatro generaciones (F₁, BC₁F₁, BC₂F₁ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares, mediante análisis *Southern blot*. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA (Figura 100). El DNA genómico del algodón T304-40 hibridado con la sonda *cry1Ab* mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento T304-40 a nivel genómico (Figura 101 - 108) (sección I.j.2) **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

Figura 100. Esquema del T-DNA del plásmido pTDL008 indicando los sitios de restricción de la enzima *EcoRV* y la posición de la sonda utilizada.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 101. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0466 (cultivar 983050 – 99MS88).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 102. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0467 (cultivar Coker 315).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 103. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0468 (cultivar 9740).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 104. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 32CON0469 (cultivar 97201-16).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Figura 105. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000740 (generación BC₂F₂).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 106. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000741 (generación BC₂F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 107. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000742 (generación BC₁F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 108. Estabilidad del evento T304-40 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GAGH000743 (generación F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

3. Evento GHB119.

La estabilidad estructural del evento GHB119 fue demostrada a través de tres generaciones (F₁, BC₁F₁, BC₂F₁) y en diferentes cultivares, mediante análisis *Southern blot*. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA produciendo dos fragmentos de hibridación (Figura 109). El DNA genómico del algodón GHB119 hibridado con la sonda T-DNA mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento GHB119 a nivel genómico (Figura 110 - 113) (sección I.j.2) **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

Figura 109. Esquema del T-DNA del plásmido pTEM12 indicando los sitios de restricción de la enzima *EcoRV* y la posición de la sonda utilizada.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 110. Estabilidad del evento GHB119 en diferentes cultivares de algodón - lote 05GC03 (cultivar Coker 312).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 111. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



Figura 112. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC₁F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 113. Estabilidad del evento GHB119 a través de diferentes generaciones (generación BC₂F₁).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

4. Evento COT102.

La estabilidad del evento COT102 fue analizada utilizando plantas de cinco generaciones. Plantas individuales de las generaciones F₁, BC₁F₂, BC₂F₁, BC₂F₂ y BC₃F₁ fueron analizadas para determinar la expresión de la proteína Vip3Aa19 (VIP3/VIP3A) mediante un ensayo cualitativo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA).

Todas las generaciones segregaron como se esperaba para un sitio de inserción único. La progenie F₁ fue producida a partir de una población homocigota y, como se esperaba, todas las plantas expresaron la proteína Vip3Aa19. Las otras cuatro generaciones evaluadas produjeron los resultados esperados con relación a la expresión de la proteína Vip3Aa19. El valor crítico de Ji cuadrada para rechazar la hipótesis nula fue de 3.84 (p=0.05) con un grado de libertad (Strickberger, 1976)²³. Un valor menor a 3.84 indica que la herencia del gen *vip3Aa19* se comporta siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante. El sitio de inserción permanece estable a través de múltiples generaciones de autopolinización y retrocruzas (Artim *et al.*, 2003) (sección j.2).

El evento COT102 (SYN-IR102-7) es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutricional y toxicológica del evento COT102 sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

5. Evento GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

La estabilidad de los insertos GHB614, T304-40 y GHB119 fue evaluada en el ADN genómico del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 digerido con la enzima *EcoRV*. Después de la hibridación con las sondas T-DNA y *cry1Ab*, todas las muestras de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 mostraron fragmentos de tamaño comparable a los obtenidos en las líneas parentales GHB614, T304-40, GHB119 y T304-40 x GHB119.

La estabilidad del inserto COT102 fue evaluada a partir de muestras de ADN genómico de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 digerido con las enzimas *BamHI* y *NheI*. Después de la hibridación con las sondas de *vip3Aa19* y *aph4*, todas las muestras de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 mostraron fragmentos de tamaño comparable a los obtenidos en la línea parental COT102, demostrando la estabilidad del evento COT102.

²³ Los valores mayores al valor crítico se presentarían una vez en veinte oportunidades si la hipótesis es correcta.



La metodología, análisis *Southern blot* y los resultados que demuestran la estabilidad estructural de los insertos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 son **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

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

La medición de la expresión génica se puede determinar mediante la cuantificación directa del producto del gen, que en general es una proteína. Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 fueron determinados mediante la técnica de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) y analizados estadísticamente en raíz, hoja, cuadros, bellotas, polen y semilla de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V6, inicio de cuadros, floración y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos (Georgia, Arkansas y Texas), durante el ciclo 2013 **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**. Los resultados de la determinación del nivel de expresión de las proteínas se presentan en los Cuadros 38 - 43.

Cuadro 38. Niveles de expresión de la proteína **Cry1Ab** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Cry1Ab (µg/g peso seco)		Cry1Ab (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	12.70 ± 4.02	5.68 - 18.39	2.93 ± 0.79	1.77 - 3.87
	Raíz	9.05 ± 2.26	5.10 - 11.74	1.94 ± 0.38	1.46 - 2.49
Inicio de cuadros	Hoja	16.37 ± 6.05	6.67 - 26.26	3.41 ± 1.38	1.42 - 5.74
Floración	Polen	NA	NA	0.13 ± 0.09	0.04 - 0.29
2 semanas después de primera flor	Hoja	6.12 ± 1.80	3.62 - 10.29	1.72 ± 0.57	0.97 - 3.15
	Cuadros	7.66 ± 1.51	5.30 - 10.49	1.69 ± 0.26	1.34 - 2.25
	Bellotas	5.64 ± 1.44	2.95 - 7.65	0.95 ± 0.24	0.56 - 1.27
	Planta completa	5.30 ± 3.32	0.71 - 10.55	1.51 ± 0.93	0.19 - 3.10
Madurez	Semilla	3.94 ± 0.74	2.98 - 5.32	3.41 ± 0.59	2.56 - 4.33

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 39. Niveles de expresión de la proteína **Cry2Ae** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Cry2Ae (µg/g peso seco)		Cry2Ae (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	152.34 ± 45.64	96.54 – 252.90	35.76 ± 10.53	21.95 - 52.34
	Raíz	12.26 ± 3.64	7.25 - 17.21	2.74 ± 1.09	1.55 - 4.28
Inicio de cuadros	Hoja	165.61 ± 56.59	94.01 - 233.28	33.88 ± 10.98	20.25 - 49.55
Floración	Polen	NA	NA	0.13 ± 0.06	0.05 - 0.29
2 semanas después de primera flor	Hoja	101.42 ± 16.45	78.61 - 133.41	28.39 ± 5.24	20.60 - 37.63
	Cuadros	29.99 ± 10.73	19.56 - 55.03	6.86 ± 3.07	4.05 - 14.17
	Bellotas	17.98 ± 4.92	11.11 - 30.29	3.06 ± 0.94	1.72 - 5.46
	Planta completa	77.82 ± 24.79	55.43 - 137.79	22.27 ± 7.12	13.72 - 39.42
Madurez	Semilla	21.38 ± 2.37	18.14 - 25.34	18.55 ± 2.17	15.56 - 21.81

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.

Cuadro 40. Niveles de expresión de la proteína **Vip3Aa19** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	Vip3Aa19 (µg/g peso seco)		Vip3Aa19 (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	167.54 ± 72.47	77.74 - 271.57	37.11 ± 11.63	25.59 - 57.62
	Raíz	74.53 ± 22.90	30.56 - 101.67	15.70 ± 3.52	8.46 - 20.79
Inicio de cuadros	Hoja	312.49 ± 69.47	211.68 - 416.78	64.26 ± 14.03	45.93 - 87.31
Floración	Polen	NA	NA	0.42 ± 0.09	0.29 - 0.57
2 semanas después de primera flor	Hoja	91.66 ± 20.32	60.65 - 118.37	25.69 ± 6.16	15.26 - 31.93
	Cuadros	71.83 ± 16.58	38.16 - 90.87	15.82 ± 2.87	9.83 - 19.47
	Bellotas	62.62 ± 15.91	44.42 - 91.51	10.63 ± 2.91	7.08 - 15.53
	Planta completa	63.59 ± 26.43	29.57 - 116.24	17.78 ± 6.70	9.82 - 34.10
Madurez	Semilla	6.69 ± 1.25	5.02 - 8.86	5.79 ± 1.01	4.34 - 7.45

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 41. Niveles de expresión de la proteína **2mEPSPS** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	2mEPSPS (µg/g peso seco)		2mEPSPS (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	337.59 ± 68.93	251.53 - 447.39	80.89 ± 22.74	48.50 - 110.11
	Raíz	82.86 ± 14.95	49.70 - 103.18	17.75 ± 1.76	14.18 - 20.81
Inicio de cuadros	Hoja	1519.53 ± 478.40	659.30 - 2068.93	315.86 ± 111.11	140.20 - 453.21
Floración	Polen	NA	NA	5.96 ± 3.63	1.38 - 12.70
2 semanas después de primera flor	Hoja	452.3 ± 125.62	340.80 - 785.88	125.57 ± 31.80	96.66 - 206.19
	Cuadros	313.13 ± 60.14	242.45 - 418.57	69.30 ± 10.07	57.08 - 89.69
	Bellotas	127.73 ± 17.10	101.49 - 156.75	21.51 ± 2.56	18.01 - 25.76
	Planta completa	240.63 ± 99.08	122.26 - 425.44	68.31 ± 27.98	40.57 - 121.70
Madurez	Semilla	123.25 ± 9.53	105.44 - 133.25	106.78 ± 7.94	95.09 - 119.67

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.

Cuadro 42. Niveles de expresión de la proteína **PAT/bar** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	PAT/bar (µg/g peso seco)		PAT/bar (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	557.04 ± 60.87	435.82 - 650.48	141.21 ± 63.01	84.57 - 281.95
	Raíz	273.54 ± 71.48	183.73 - 382.20	58.34 ± 9.74	43.79 - 72.38
Inicio de cuadros	Hoja	1425.41 ± 495.75	836.31 - 2210.67	288.57 ± 84.15	182.56 - 435.60
Floración	Polen	NA	NA	0.70 ± 0.52	0.17 - 1.66
2 semanas después de primera flor	Hoja	900.52 ± 284.91	527.54 - 1373.43	250.66 ± 78.49	145.75 - 360.34
	Cuadros	1141.01 ± 319.25	738.50 - 1544.70	250.59 ± 56.35	176.79 - 324.06
	Bellotas	423.67 ± 77.84	324.57 - 547.88	71.32 ± 12.06	52.83 - 87.82
	Planta completa	475.65 ± 112.84	280.49 - 653.81	134.86 ± 28.10	93.09 - 191.80
Madurez	Semilla	259.44 ± 27.46	204.28 - 294.51	224.65 ± 22.11	184.20 - 252.71

La media, desviación estándar y rango se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo) excepto semilla (n=11). La media y desviación estándar (SD) fueron redondeados a dos decimales. NA = no aplicable.



Cuadro 43. Niveles de expresión de la proteína **APH4** en tejidos de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

Etapa de desarrollo	Matrix	APH4 (µg/g peso seco)		APH4 (µg/g peso fresco)	
		Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 6 hojas	Hoja	ND	<LLOQ	ND	<LLOQ
	Raíz	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
Inicio de cuadros	Hoja	0.65 ± 0.12 ^a	<LOQ – 0.80	0.12 ± 0.02 ^a	<LOD – 0.15
Floración	Polen	NA	NA	ND	<LOD - <LLOQ
2 semanas después de primera flor	Hoja	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Cuadros	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Bellotas	ND	<LOD - <LLOQ	ND	<LOD - <LLOQ
	Planta completa	ND	<LOD	ND	<LOD
Madurez	Semilla	ND	<LOD ^b	ND	<LOD ^b

Muestras con cantidades no cuantificables de la proteína APH4 estuvieron por debajo del límite de detección (<LOD) o por debajo del límite menor de cuantificación (LLOQ) y no fueron determinadas (ND). NA = No Aplicable.

^a La media y desviación estándar (SD) para peso seco y peso fresco se basan en un total de 6 repeticiones para dos ensayos, el resto de los sitios no fueron cuantificables (<LLOQ o <LOD).

^b El rango para peso seco y peso fresco se basa en un total de 11 repeticiones de tres ensayos.

c) Características del fenotipo del OGM.

El algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102** fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614, T304-40, GHB119 y COT102. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros.

El evento **GHB614** produce la proteína 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS) codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz (*Zea mays* L.), esta proteína confiere tolerancia al herbicida glifosato. La proteína 2mEPSPS difiere de la proteína nativa del maíz únicamente por la sustitución de dos aminoácidos.

El evento **T304-40** produce la proteína insecticida Cry1Ab codificada por el gen *cry1Ab* de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*, esta proteína es efectiva para el control de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*) y gusano tabacalero (*Heliothis virescens*). El algodón T304-40 también expresa la proteína fosfinothricin acetyl transferase (PAT/*bar*), codificada por el gen *bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, utilizado como marcador de selección y que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El evento **GHB119** produce la proteína insecticida Cry2Ae codificada por el gen *cry2Ae* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota*, esta proteína es efectiva para el control de insectos plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). El algodón GHB119 también expresa la



proteína phosphinothricin acetyl transferase (PAT/*bar*), codificada por el gen *bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, utilizado como marcador de selección y que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El evento **COT102** produce la proteína insecticida Vip3Aa19 codificada por el gen *vip3Aa19* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* cepa AB88, esta proteína confiere resistencia al ataque de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusanos falsos medidores (*Pseudoplusia includens/ Trichoplusia ni*) y gusano perforador de la hoja (*Bucculatrix thurberiella*). El algodón COT102 también contiene el marcador de selección hygromycin B phosphotransferase (APH4).

La combinación de las proteínas insecticidas Cry1Ab (T304-40), Cry2Ae (GHB119) y Vip3Aa19 (COT102), proveen un control más eficiente de insectos lepidópteros plaga del algodón y representa una nueva herramienta para prevenir el desarrollo de resistencia en los insectos. La combinación de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (T304-40/ GHB619) confiere tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, permitiendo el uso de dos mecanismos de acción herbicida para un manejo más eficiente de la maleza en el cultivo del algodón, esta combinación de mecanismos de acción es particularmente importante para el manejo y prevención de resistencia de las especies de maleza a los herbicidas.

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.

El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 (**GLTC**) fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614, T304-40, GHB119 y COT102. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato (proteína 2mEPSPS) y glufosinato de amonio (proteína PAT/*bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional.

Los análisis bio-informáticos, *Southern Blot* y PCR realizados en los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 demostraron que se integró únicamente una copia del T-DNA de los *cassettes* de expresión y no se detectaron elementos del esqueleto de los vectores (plásmidos), ni secuencias adicionales que pudieran tener alguna función biológica. En adición a las características de tolerancia a herbicidas (*2mepsps* y *bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (*cry1Ab*, *cry2Ae* y *vip3Aa19*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón **GLTC**. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas (promotores, péptidos de tránsito, terminadores) en el algodón **GLTC**, heredadas de los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

Las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones



naturales o dentro de un agro-ecosistema. La similitud de las características de las plantas **GLTC** con el algodón convencional nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en los mencionados eventos como consecuencia de la modificación genética.

Las características reproductivas no han sido alteradas en el algodón **GLTC**, ni en los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, a partir de los cuales se ha obtenido mediante cruzamiento convencional, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de cruzamiento convencional, cuando se compara con el algodón convencional.

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

La evaluación agronómica y fenotípica del algodón **GLTC** se realizó a partir de 8 ensayos de campo establecidos en diferentes regiones representativas del cultivo del algodón en los Estados Unidos durante la temporada 2013 ([Cuadro 44](#)). Los ensayos fueron conducidos de acuerdo con las prácticas de manejo comerciales en cada región algodonera. Cada ensayo consistió de 6 tratamientos con 4 repeticiones (24 parcelas experimentales por ensayo) en un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA). Todas las parcelas dentro de cada sitio fueron ubicadas en el mismo campo y sometidas a las mismas condiciones de crecimiento. Los tratamientos de cada sitio incluyeron algodón **GLTC** con y sin tratamiento de herbicidas, contraparte convencional y 3 líneas comerciales de algodón convencional ([Cuadro 45](#)).

Cuadro 44. Ubicación de los ensayos de campo para la evaluación agronómica y fenotípica del algodón **GLTC**.

No. de ensayo	Población/ Condado	Estado
01	Edmonson, Hale	Texas
02	East Bernard, Warton	Texas
03	Uvalde, Uvalde	Texas
04	Hinton, Caddo	Oklahoma
05	Chula, Tift	Georgia
06	Cheneyville, Rapides	Louisiana
07	Kerman, Fresno	California
10	Greenville, Washington	Mississippi



Cuadro 45. Descripción de tratamientos para la evaluación agronómica y fenotípica del algodón GLTC.

Tratamiento ^a	Descripción	Lote de semilla	Tratamiento herbicida	Sitio experimental
A	FM966	13-WAGH100041	Sin tratamiento herbicida	Todos
H	GLTC	13PRGH060001	Sin tratamiento herbicida	Todos
I	GLTC	13PRGH060001	Tratado con 2 aplicaciones de glufosinato y 1 aplicación de glifosato	Todos
B	Variedad comercial 1 (FM958)	12LUGH000332	Sin tratamiento herbicida	01 - 05
C	Variedad comercial 2 (FM989)	12LUGH000334	Sin tratamiento herbicida	01 – 05
D	Variedad comercial 3 (ST457)	12LUGH000336	Sin tratamiento herbicida	05, 06, 07, 10
E	Variedad comercial 4 (DP491)	12LUGH000335	Sin tratamiento herbicida	06, 07, 10
F	Variedad comercial 5 (ST468)	12LUGH000339	Sin tratamiento herbicida	06, 10
G	Variedad comercial 6 (Acala Maxxa)	12LUGH000541	Sin tratamiento herbicida	01 - 04, 07

La evaluación agronómica y fenotípica se realizó a través del ciclo del cultivo del algodón con base en los siguientes parámetros:

- Días a emergencia.
- Población inicial.
- Días a primera flor.
- Días a primera bellota abierta.
- Respuesta a enfermedades.
- Acame de plantas.
- Tipo de bellota.
- Porcentaje de bellotas abiertas.
- Rendimiento de fibra.
- Peso total de cosecha.
- Propiedades de fibra.
- Número de semillas por bellota.
- Tamaño de bellota.
- Índice de semilla.
- Porcentaje de fibra.
- Mapeo final de planta.
 - Altura de planta.
 - Número de nudos.
 - Primera rama fructífera.
 - Bellotas por planta.
 - Relación altura de planta/nudos totales.
 - Retención de frutos en primera y segunda posición.



Los resultados de estas evaluaciones se presentan en los cuadros siguientes:

Cuadro 46. Resumen de características de sanidad del cultivo de algodón **GLTC** y convencional.

Variable	Algodón convencional (Tratamiento A) Media ± SD	Algodón GLTC sin tratamiento herbicida (Tratamiento H)		Algodón GLTC con tratamiento herbicida (Tratamiento I)		Variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^a	A vs H CMH-Test	A vs I CMH-Test
	Media ± SD	Media ± SD	Min - Max	Media ± SD	Min - Max	Min - Max	p-value ^b	p-value ^b
Sanidad inicial (1 - 5)	4.5 ± 0.88	4.5 ± 0.95	2 - 5	4.6 ± 0.88	2 - 5	2 - 5	0.884	0.988
Vigor de plantas (1-9)	8.0 ± 1.38	6.8 ± 1.49	4 - 9	7.3 ± 1.70	4 - 9	3 - 9	0.001	0.119
Incidencia inicial de enfermedades (1-9)	1.2 ± 0.37	1.2 ± 0.45	1 - 3	1.1 ± 0.34	1 - 2	1 - 2	0.368	0.317
Sanidad a mitad de temporada (1-5)	4.8 ± 0.61	4.9 ± 0.30	4 - 5	4.9 ± 0.25	4 - 5	2 - 5	0.121	0.119
Incidencia de enfermedades al final de temporada (1-9)	2.0 ± 1.39	2.0 ± 1.34	1 - 4	2.0 ± 1.44	1 - 6	1 - 5	0.704	0.823
Acame (1-9)	1.2 ± 0.42	1.0 ± 0.18	1 - 2	1.0 ± 0.18	1 - 2	1 - 9	0.006	0.006
Sanidad del cultivo al final de temporada (1-5)	4.7 ± 0.70	4.7 ± 0.70	3 - 5	4.7 ± 0.69	3 - 5	2 - 5	1.000	0.898
Tipo de bellota (1-9)	7.0 ± 1.63	6.7 ± 1.71	3 - 9	6.8 ± 1.71	3 - 9	1 - 9	0.087	0.073

^a Rango de resultados de seis líneas comerciales de referencia (Tratamientos B - G).

^b Prueba de Cochran-Mantel-Haenszel p-value: comparación con el algodón convencional (Tratamiento A).

Cuadro 47. Resumen de características agronómicas evaluadas en el algodón **GLTC** y convencional.

Variable	Algodón convencional (Tratamiento A) Media ± SD	Algodón GLTC sin tratamiento herbicida (Tratamiento H)		Algodón GLTC con tratamiento herbicida (Tratamiento I)		Variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^a	Intervalo de tolerancia para variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^b	A vs H CMH-Test ^c	A vs I CMH-Test ^c
	Media ± SD	Media ± SD	Min - Max	Media ± SD	Min - Max	Min - Max	Bajo - Alto	p-value ^b	p-value ^b
Días a emergencia	5.8 ± 1.46	5.9 ± 1.46	4 - 9	6.1 ± 1.64	4 - 10	4 - 11	1.2 - 11.6	0.723	0.292
Población inicial ^d	69.0 ± 13.32	65.1 ± 16.28	42 - 103	65.6 ± 18.59	26 - 105	16 - 81	9.1 - 91.2	0.263	0.329
Días a floración	60.4 ± 11.33	60.3 ± 9.69	45 - 78	59.7 ± 9.58	45 - 79	45 - 84	30.4 - 90.0	0.811	0.238
Días a primera bellota abierta	111.8 ± 13.92	111.7 ± 13.04	92 - 138	111.4 ± 11.84	92 - 130	92 - 147	65.8 - 159.4	0.833	0.959
Población final ^d	64.3 ± 12.91	63.2 ± 13.16	29 - 94	60.6 ± 16.22	21 - 94	19 - 79	8.5 - 87.1	0.700	0.207
% de bellotas abiertas	56.6 ± 13.29	55.5 ± 19.32	10 - 80	60.3 ± 18.96	10 - 80	1 - 85	0 - 111.2	0.810	0.411

^a Rango de resultados de seis líneas comerciales de referencia (Tratamientos B - G).

^b Intervalo de tolerancia de 99%: Rango de las líneas comerciales basado en un intervalo de tolerancia para contener el 99% de la población con 95% de confiabilidad.

^c Prueba de t: comparación con el algodón convencional (Tratamiento A).

^d Cuento de plantas en dos secciones de 3.05 m (10 ft) de cada parcela experimental.



Cuadro 48. Resumen de datos obtenidos del mapeo final de plantas de algodón **GLTC** y convencional.

Variable	Algodón convencional (Tratamiento A) Media ± SD	Algodón GLTC sin tratamiento herbicida (Tratamiento H)		Algodón GLTC con tratamiento herbicida (Tratamiento I)		Variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^a	Intervalo de tolerancia para variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^b	A vs H CMH-Test ^c	A vs I CMH-Test ^c
	Media ± SD	Media ± SD	Min - Max	Media ± SD	Min - Max	Min - Max	Bajo - Alto	p-value ^b	p-value ^b
Promedio de altura (cm)	75.9 ± 24.7	74.9 ± 24.0	37.6 - 120.7	74.7 ± 22.2	41.8 - 127.5	39.7 - 132.3	9.0 - 143.4	0.637	0.590
Nudos por planta	17.9 ± 2.4	18.7 ± 2.8	13.3 - 24.6	18.9 ± 2.7	13.3 - 25.6	12.0 - 25.0	11.0 - 26.2	0.025	0.004
Altura/ Nudos totales	4.17 ± 1.03	3.96 ± 0.94	2.18 - 5.57	3.93 ± 0.93	2.37 - 6.02	2.21 - 6.30	1.26 - 6.87	0.041	0.022
Promedio primera rama fructífera	6.6 ± 1.63	6.8 ± 2.07	3.1 - 9.4	6.9 ± 2.12	2.2 - 9.9	1.5 - 10.2	0.6 - 12.2	0.402	0.174
Promedio número de ramas fructíferas Bellotas/Planta	8.1 ± 2.3	8.9 ± 2.2	5.9 - 15.1	9.1 ± 2.2	6.2 - 16.3	5.5 - 15.8	3.1 - 15.0	0.065	0.030
Promedio de sitios potenciales de bellota/planta	19.8 ± 8.5	21.0 ± 8.0	10.1 - 36.3	20.8 ± 7.3	11.1 - 43.1	10.6 - 44.2	0 - 47.8	0.414	0.470
% de retención de frutos	43.2 ± 12.7	44.5 ± 12.5	23.8 - 70.2	45.0 ± 12.6	24.0 - 66.9	16.0 - 85.8	0.1 - 89.3	0.617	0.486
% de bellotas cosechables	32.0 ± 10.9	33.0 ± 13.4	13.4 - 60.3	32.8 ± 13.4	16.0 - 59.7	9.0 - 76.0	0 - 67.7	0.718	0.767
Total de bellotas/planta	8.7 ± 2.2	9.5 ± 2.4	6.4 - 15.6	9.7 ± 2.2	6.8 - 17.2	5.8 - 16.9	2.4 - 18.1	0.236	0.164

^a Rango de resultados de seis líneas comerciales de referencia (Tratamientos B - G).

^b Intervalo de tolerancia de 99%: Rango de las líneas comerciales basado en un intervalo de tolerancia para contener el 99% de la población con 95% de confiabilidad.

^c Prueba de t: comparación con el algodón convencional (Tratamiento A).

Cuadro 49. Resumen de características de bellota y rendimiento de algodón **GLTC** y convencional.

Variable	Algodón convencional (Tratamiento A) Media ± SD	Algodón GLTC sin tratamiento herbicida (Tratamiento H)		Algodón GLTC con tratamiento herbicida (Tratamiento I)		Variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^a	Intervalo de tolerancia para variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^b	A vs H CMH-Test ^c	A vs I CMH-Test ^c
	Media ± SD	Media ± SD	Min - Max	Media ± SD	Min - Max	Min - Max	Bajo - Alto	p-value ^b	p-value ^b
Rendimiento algodón hueso (kg/ parcela)	3.68 ± 1.08	3.48 ± 1.05	1.78 - 5.45	3.58 ± 1.11	1.10-5.33	0.94 - 5.70	0 - 6.70	0.234	0.555
% de fibra (25 bellotas)	39.93 ± 2.08	39.39 ± 1.95	35.61 - 42.70	40.00 ± 2.02	35.59 - 43.54	32.59 - 48.62	31.75 - 47.97	0.336	0.889
Rendimiento de fibra (kg/parcela)	1.48 ± 0.47	1.37 ± 0.42	0.69 - 2.15	1.43 ± 0.44	0.40 - 2.15	0.40 - 2.46	0 - 2.81	0.132	0.455
Rendimiento de fibra (kg/ha)	1302.1 ± 394.5	1204.0 ± 343.12	485.07 - 1927.1	1255.8 ± 360.54	430.19 - 1927.1	330.40 - 2204.9	0 - 2416.7	0.120	0.456
Rendimiento algodón hueso (kg/ha)	3244.3 ± 897.88	3060.9 ± 870.03	1251.3 - 4884.9	3141.8 ± 905.54	1183.2 - 4723.5	857.58 - 5082.0	0 - 5759.9	0.231	0.499



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de Algodón GlyToI™ TwinLink™ Plus (GLTC) en etapa experimental, ciclo PV-2016

Peso de 25 bellotas (g)	147.2 ± 17.8	133.2 ± 17.5	98.8 - 181.8	135.9 ± 14.4	101.2 - 164.3	103.7 - 184.7	95.7 - 190.2	0.003	0.016
Peso total de semilla de 25 bellotas (g)	86.0 ± 10.5	78.6 ± 10.2	59.4 - 103.9	79.8 ± 8.7	57.2 - 93.6	58.1 - 109.9	54.4 - 112.8	0.009	0.027
Índice de semilla (peso de 100 semillas) (g)	11.6 ± 1.69	10.9 ± 1.81	8.0 - 15.0	11.1 ± 1.66	8.8 - 15.0	8.8 - 16.0	6.8 - 15.5	0.016	0.074
Peso de fibra de 25 bellotas (g)	58.8 ± 8.2	52.6 ± 8.2	37.6 - 76.3	54.5 ± 7.2	40.3 - 67.6	42.5 - 73.9	34.9 - 78.9	0.003	0.034
Peso promedio de bellotas (g)	5.89 ± 0.71	5.33 ± 0.70	4.0 - 7.3	5.44 ± 0.59	4.0 - 6.6	4.1 - 7.4	3.82 - 7.63	0.004	0.017
Peso promedio de semillas por bellota	30.1 ± 4.1	29.1 ± 3.3	21.3 - 38.5	29.0 ± 3.1	22.1 - 34.3	21.0 - 42.3	18.2 - 42.1	0.173	0.145

^a Rango de resultados de seis líneas comerciales de referencia (Tratamientos B - G).

^b Intervalo de tolerancia de 99%: Rango de las líneas comerciales basado en un intervalo de tolerancia para contener el 99% de la población con 95% de confiabilidad.

^c Prueba de *t*: comparación con el algodón convencional (Tratamiento A).

Cuadro 50. Resumen de características de calidad de fibra de algodón **GLTC** y convencional.

Variable	Algodón convencional (Tratamiento A) Media ± SD	Algodón GLTC sin tratamiento herbicida (Tratamiento H)		Algodón GLTC con tratamiento herbicida (Tratamiento I)		Variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^a	Intervalo de tolerancia para variedades convencionales de referencia (Tratamientos B - G) ^b	A vs H CMH-Test ^c	A vs I CMH-Test ^c
	Media ± SD	Media ± SD	Min - Max	Media ± SD	Min - Max	Min - Max	Bajo - Alto	p-value ^b	p-value ^b
Micronaire	4.21 ± 0.73	3.88 ± 0.78	2.2 - 4.8	3.94 ± 0.75	2.2 - 4.8	2.1 - 5.3	1.85 - 6.54	0.002	0.010
Longitud (cm)	2.97 ± 0.10	3.06 ± 0.13	2.79 - 3.28	3.06 ± 0.11	2.74 - 3.23	2.74 - 3.23	2.70 - 3.32	<.001	<.001
Uniformidad (%)	84.7 ± 1.1	84.5 ± 1.4	80.4 - 86.9	84.7 ± 1.3	82.1 - 87.2	81.6 - 87.1	80.8 - 88.3	0.368	0.890
Resistencia (g/tex)	34.6 ± 3.0	33.2 ± 3.3	26.1 - 38.4	33.9 ± 2.6	29.0 - 40.0	26.3 - 39.4	25.5 - 42.0	0.007	0.169
Elongación	5.37 ± 1.19	5.04 ± 1.11	2.9 - 6.7	4.92 ± 1.13	2.7 - 6.8	4.4 - 11.2	2.33 - 11.09	0.012	<.001
Color: Gris (Rd)	78.7 ± 4.1	78.7 ± 4.0	69.8 - 84.3	78.6 ± 3.8	69.9 - 83.8	66.5 - 83.6	65.5 - 89.3	0.966	0.864
Color: Amarillez (+b)	7.46 ± 0.97	7.56 ± 1.35	5.9 - 11.6	7.45 ± 1.17	6.1 - 10.5	6.6 - 11.4	4.98 - 11.12	0.422	0.961

^a Rango de resultados de seis líneas comerciales de referencia (Tratamientos B - G).

^b Intervalo de tolerancia de 99%: Rango de las líneas comerciales basado en un intervalo de tolerancia para contener el 99% de la población con 95% de confiabilidad.

^c Prueba de *t*: comparación con el algodón convencional (Tratamiento A).

Los resultados indican que los valores de las variables evaluadas en el algodón **GLTC** están dentro del rango determinado para las variedades comerciales de referencia (convencionales), lo que demuestra la equivalencia agronómica y fenotípica del algodón **GLTC** con relación al algodón convencional.

En adición al estudio de características agronómicas y fenotípicas, se analizó la característica de germinación de la semilla de algodón **GLTC** y convencional (FM666), mediante la prueba de



germinación estándar y germinación en frío. Para la prueba de germinación estándar se utilizaron 400 semillas que se incubaron a 30 ± 2 °C y se evaluó la germinación a los 4 y 8 días. Para la prueba de germinación en frío se utilizaron 200 semillas que se incubaron a 10 ± 2 °C y se evaluó la germinación a los 3 y 8 días. Los datos obtenidos mostraron un porcentaje de germinación para la prueba estándar de 96.8% para el algodón **GLTC** y 96.5% para el algodón convencional FM966; asimismo para la prueba de germinación en frío los resultados fueron 94% para el algodón **GLTC** y 88.0% para el algodón convencional FM966. El análisis estadístico de los datos mediante la prueba exacta de Fisher ($p = 0.877$) y *ji-cuadrada* (χ^2) ($p = 0.108$) demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas para la variable de germinación entre algodón **GLTC** y convencional FM966.

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

1. Algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614, T304-40, GHB119 y COT102. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato (proteína 2mEPSPS) y glufosinato de amonio (proteína PAT/*bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional.

Las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agro-ecosistema. La similitud de las características de las plantas **GLTC** con el algodón convencional permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga o maleza en el algodón **GLTC** como consecuencia de la modificación genética.

Las características reproductivas no han sido alteradas en el algodón **GLTC**, ni en los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, a partir de los cuales se ha obtenido mediante cruzamiento convencional, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de cruzamiento convencional, cuando se compara con el algodón convencional.

Los productos derivados del procesamiento industrial de la semilla de algodón son aceite para consumo humano, harina de algodón (suplemento alto en proteína para ganado y aves), cascarilla (fibra para ganado vacuno) y *linter* (celulosa para productos industriales y de consumo humano) (www.cottonseed.com²⁴). En general los análisis de composición de aceite refinado de diferentes cultivos oleaginosos, así como el análisis de *linter* procesado, han demostrado la ausencia de proteína detectable en estos productos (Hamilton *et al.*, 2002; Health Canada, 2013; Sims, *et al.*, 1995). Por lo tanto, el consumo humano significativo de las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 presentes en las variedades de algodón **GLTC** es muy poco probable y no

²⁴ National Cottonseed Products Association (NCPA).



existe una preocupación significativa sobre algún impacto en la salud, basado en la falta de exposición significativa a las proteínas.

2. Inocuidad de la proteína 2mEPSPS.

La tolerancia al glifosato se obtiene disminuyendo la habilidad del herbicida para inhibir la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias. En el algodón **GLTC** la tolerancia al glifosato se basa en la expresión de la enzima 2mEPSPS codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz, en el cual se han incluido dos cambios para adaptarlo al uso preferido de codones del algodón. La proteína 2mEPSPS con baja afinidad por el glifosato, es altamente resistente a la inhibición por este herbicida y permite suficiente actividad enzimática para que las plantas puedan desarrollarse en presencia de herbicidas que contengan glifosato. La seguridad de la proteína 2mEPSPS ha sido evaluada exhaustivamente en diversos estudios científicos y los resultados han confirmado su inocuidad. La enzima 2mEPSPS no posee ninguna propiedad asociada con toxinas o alérgenos conocidos, incluyendo la falta de similitud de secuencia de aminoácidos con toxinas y alérgenos conocidos, una rápida degradación en fluidos gástricos e intestinales simulados y la ausencia de efectos adversos en ratón después administración intravenosa u oral a dosis de 10 o 2000 mg/kg de peso corporal. En conclusión, no se espera ningún riesgo derivado de la inclusión de la proteína 2mEPSPS en la cadena alimenticia humana o animal (Herouet *et al.*, 2009).

3. Inocuidad de la proteína PAT/*bar*.

Por su uso tan extendido en cultivos biotecnológicos, la seguridad de la proteína PAT ha sido ampliamente evaluada. Cuando la secuencia de aminoácidos de la enzima PAT se sometió a análisis comparativo de polipéptidos usando el algoritmo FASTDB de Intelligenetics, no mostró una homología significativa con otras proteínas presentes en las bases de datos, excepto con otras fosfinotricina acetiltransferasas que se originan a partir de diferentes organismos. No se observó semejanza con toxinas potenciales o con alérgenos. No se esperan efectos tóxicos o alérgicos provenientes de PAT, ya que las acetiltransferasas no poseen estabilidad proteolítica o térmica y tiene una alta especificidad de sustrato (Herouet *et al.*, 2005).

4. Inocuidad de las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

Los insecticidas microbiales a base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tienen una historia de uso seguro en la agricultura de alrededor de 50 años. Las proteínas Cry están entre los ingredientes activos de estos insecticidas y actualmente los genes que codifican estas proteínas han sido introducidos en diversos cultivos mediante técnicas de ingeniería genética. Lo anterior implica que las proteínas Cry han sido usadas y consumidas de forma segura por humanos y animales durante décadas (Betz *et al.*, 2000; Onose *et al.*, 2008; McClintock *et al.*, 1995). Los niveles de proteínas Cry expresadas en los cultivos GM son muy bajos y se reducen todavía más debido al procesamiento de los alimentos. Adicionalmente, la extensa evaluación de proteínas Cry en cultivos GM no han mostrado ningún daño o efecto negativo en especies no blanco, incluyendo los humanos (Koch *et al.*, 2015).

La proteína Cry1Ab producida por el algodón GLTC con resistencia a insectos se derivan de la bacteria común del suelo *Bacillus thuringiensis* y es específicamente tóxica para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojó



valores de NOEL²⁵ en concentraciones que representan diez veces o más las concentraciones ambientales esperadas de Cry1Ab (Cuadro 51) (ILSI, 2011).

Cuadro 51. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco.

Especie	Método de exposición	Duración de la exposición	Resultados
<i>Apis mellifera</i> larvas de abejas	Exposición a una sola dosis de proteína a 20 ppm	unidosis	NOEL >20 ppm
<i>Apis mellifera</i> abeja adulta	Exposición a una sola dosis a 20 ppm	unidosis	No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones de prueba y de control. En el grupo de prueba, la mortalidad media fue de 16.2%
<i>Chrysoperla carnea</i> (larvas de crisopa)	Exposición a 16.7 ppm	7 días	NOEL > 16.7 ppm
<i>Hippodamia convergens</i> (catarinas)	Exposición a una sola dosis a 20 ppm	unidosis	NOEL > 20 ppm
<i>Brachymeria intermedia</i> (himenóptero parasitoide)	Exposición a una sola dosis a 20 ppm	unidosis	NOEL > 20 ppm
<i>Folsomia candida</i> (Colémbolos)	Tejidos liofilizados de hojas (estimado de 50.6 µg Cry1Ab/g)	28 días	NOEL > 50% de la dieta
<i>Daphnia magna</i>	Exposición a la proteína Cry1Ab en el polen del maíz en múltiples concentraciones	48 horas	NOEC > 150 mg/L
Lombriz de tierra	Exposición a la proteína Cry1Ab bacteriana en un sustrato de suelo artificial	14 días	NOEL > 200 ppm
<i>Mus musculus</i> (ratón)	Sonda aguda por vía oral a 3280 mg/kg	unidosis	Efecto no observado

Fuente: ILSI. 2011. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ab. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

En general muy pocas proteínas son tóxicas al ser ingeridas (Delaney *et al.*, 2008), sin embargo, para determinar la toxicidad de las proteínas en forma directa, la mejor estrategia es a través de estudios de toxicidad aguda evaluando concentraciones altas de la proteína durante un periodo corto de tiempo (Sjoblad *et al.*, 1992). Aunado a esto se cuenta con el hecho de que la exposición oral es considerada como la vía de exposición más relevante para la exposición a través de alimentos GM (Delaney *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, se realizó un estudio de toxicidad oral aguda utilizando proteína Cry1Ab producida en *E. coli* (lote MIN1443, pureza >98%), la cual es idéntica a la producida por el algodón GLTC. En el estudio se utilizaron ratones hembra OF1 a los cuales se les administró una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal y todos los animales fueron observados durante un periodo de 15 días, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones OF1 y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry1Ab es mayor a 2000

²⁵ NOEL, NOAEL – (Nivel de Efecto No Observado, Nivel de Efecto Adverso No Observado) – La máxima dosis en un estudio toxicológico en el cual no fueron observados efectos tóxicos.



mg/kg de peso corporal (Rouquie, 2007²⁶). De la misma manera, se realizó un estudio de toxicidad aguda con la proteína Cry2Ae producida en *B. thuringiensis* (lote 1410_Cry2Ae, pureza 90%) a una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, administrada vía oral a un grupo de 6 ratones macho y 6 ratones hembra C57BL/6J, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones C57BL/6J y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry2Ae es mayor a 2000 mg/kg de peso corporal (Totis, 2015²⁷).

5. Inocuidad de la proteína Vip3Aa19.

Las proteínas Vip3Aa producidas por el algodón GLTC con resistencia a insectos se derivan de las bacterias comunes del suelo *Bacillus thuringiensis* y son específicamente tóxicas para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojó valores de NOEL en concentraciones significativamente mayores que las concentraciones ambientales esperadas de Vip3Aa (Cuadro 52). Los estudios de campo sugieren que el cultivo de plantas de maíz GM que expresan Vip3Aa no afecta la abundancia de artrópodos no blanco, con la posible excepción de los depredadores específicos de las plagas blanco controladas por Vip3Aa. La proteína Vip3Aa en plantas puede ser tóxica para los lepidópteros no blanco, pero las evaluaciones regulatorias de riesgo para los productos aprobados han concluido que es posible reducir el riesgo cuando se lo compara con otras prácticas de control de insectos. El peso de las pruebas de los análisis de fenotipo y de composición demuestra que la expresión de Vip3Aa en los eventos aprobados de maíz y algodón no alteró la fisiología general de las plantas del cultivo e indica que dichas plantas no tienen más probabilidades de convertirse en malezas ni en invasivas que sus equivalentes convencionales (ILSI, 2012).

Cuadro 52. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco.

Especie	Método de exposición	Duración de la exposición	Resultados
<i>Aleochara bilineata</i> (estafilínido)	Exposición a dieta de 500 µg/g	35 días	NOEC > 500 µg/g
<i>Apis mellifera</i> (larvas de abeja)	Exposición a proteína en dieta de 500 µg/g	24 días	NOEC > 500 µg/g
<i>Chrysoperla carnea</i> (larvas de crisopa)	Exposición a 21.7 ppm	13 días	NOEC > 21.7 ppm
	Exposición a dieta de 7.25 mg/g	30 días	NOEC > 7.25 mg/g
<i>Coccinella septempunctata</i> (catarinas)	Exposición a dieta de 7.25 mg/g	15 días	NOEC > 7.25 mg/g
<i>Coleomegilla maculata</i> (catarinas)	Exposición a dieta de 7.24 µg/g	20 días	NOEL > 7.24 µg/g
<i>Colinus virginianus</i> (codorniz)	Exposición a 400 mg/kg de peso corporal	unidosis	NOEL > 400 mg/kg
<i>Daphnia magna</i>	Exposición a 10 µg/L de agua	48 horas	NOEC > 10 µg/l
<i>Eisenia foetida</i> (lombriz)	Exposición a la proteína Vip3Aa en 3.6 µg/g en suelo artificial	14 días	NOEL > 3.6 µg/g
<i>Folsomia candida</i> (colémbolos)	Exposición a dieta de 43.2 µg/g	28 días	NOEC > 43.2 µg/g

²⁶ Rouquie, D. 2007. Cry1Ab protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-295507-01-1.

²⁷ Totis, M. 2015. Cry2Ae protein. Acute toxicity study by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-508050-01-1.



<i>Gallus domesticus</i> (pollo)	Exposición a dieta de 0.588 µg/g	49 días	NOEC > 0.588 µg/g
<i>Ictalurus punctatus</i> (bagre)	Exposición a dieta de 7.1 µg/g	30 días	NOEC > 7.1 µg/g
<i>Mus musculus</i> (ratón)	Sonda aguda por vía oral a 1250 - 3675 mg/kg	unidosis	NOEL > 3675 mg/kg
<i>Orius insidiosus</i> (chinche pirata)	Exposición a dieta de 7.25 mg/g	21 días	NOEC > 7.25 mg/g

Fuente: ILSI. 2012. Revisión de la seguridad ambiental de Vip3Aa. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

6. Potencial como maleza.

El algodón (*Gossypium spp.*) es una planta domesticada que carece de características agresivas o de características distintivas de las especies vegetales consideradas como maleza. Esta planta ha sido cultivada por el valor de su fibra durante siglos en varios países, sin que exista ningún reporte que la clasifique como una planta invasiva o como una maleza (OECD, 2008). Investigadores y reguladores han evaluado el potencial para que las variedades de algodón GM se conviertan en maleza y han determinado que las nuevas características conferidas mediante ingeniería genética no aumentan el potencial del algodón para convertirse en una maleza agrícola, debido a que las plantas voluntarias de algodón pueden controlarse mediante técnicas convencionales de manejo de maleza (Carpenter *et al.*, 2002; Artim *et al.*, 2003, USEPA, 2008). Un ejemplo de lo anterior es el algodón en los Estados Unidos de América, en donde el cultivo fue introducido hace varios siglos y hasta la fecha no se tiene evidencia de que este cultivo se haya convertido en una maleza (Scott *et al.*, 2008²⁸)

Tradicionalmente los programas de mejoramiento genético de algodón han desarrollado y liberado una gran cantidad de variedades en diferentes ambientes, las cuales incorporan nuevas características de resistencia a enfermedades e insectos, tolerancia a factores ambientales (calor, frío, sequía) y se han mejorado características fenotípicas como mayor vigor de germinación, crecimiento de plántula y precocidad, así como características de calidad de fibra, sin que a la fecha se tenga evidencia de que alguna de estas variedades se haya convertido en maleza. Los cultivos modificados mediante ingeniería genética, los cuales son altamente específicos, no deben presentar un nivel de riesgo diferente que las variedades mejoradas desarrolladas por métodos convencionales (Scott *et al.*, 2008).

La maleza se constituye por un grupo de plantas que se pueden considerar como plaga. El término maleza es utilizado para describir una planta nociva en un ecosistema manejado como son las plantaciones agrícolas o forestales. Típicamente una maleza es una especie vegetal que se distribuye fácilmente en áreas perturbadas o entre los cultivos. El potencial de maleza es una medida de la capacidad de las plantas para colonizar satisfactoriamente un ecosistema, especialmente cuando esto puede ocasionar el desplazamiento de otras especies. Baker (1965) y Morishita (2012) han descrito las características ideales de la maleza, mismas que incluyen:

- Germinación discontinúa y semillas con períodos de latencia largos.
- Crecimiento en estado de plántula muy acelerado.

²⁸ Scott, A.; Bushey, D.; Freyssinet, M.; Poe, M.; Rinehardt, M. 2008. 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-GHØ4-7 x BCS-GHØ5-8. BayerCropScience LP. Research Triangle Park, NC, USA.



- Crecimiento rápido para llegar al estado reproductivo.
- Período de producción continua de semillas prolongado.
- Autocompatible, pero no necesariamente auto polinizable o apomítica.
- Si entrecruza utiliza el viento o polinizadores no especializados.
- Gran producción de semillas en condiciones favorables.
- Germinación y producción de semillas en amplia variedad de condiciones.
- Alta tolerancia o plasticidad a la variación climática y edáfica.
- Adaptaciones especiales para dispersión.
- Adaptación a las prácticas de manejo agronómico de los cultivos.
- Buena competitividad, lograda mediante compuestos alelopáticos, etc.
- Si es perenne, entonces una reproducción vegetativa vigorosa, quebradiza en los nudos inferiores o de rizomas o raíces, y capacidad de regeneración a partir de estacas.

En general la característica de maleza depende de una ventaja selectiva de muchos genes que funcionan en combinación, que no están relacionados con los genes introducidos por razones agronómicas. No se cuenta con reportes de plantas de algodón actuando como maleza en los campos agrícolas.

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

El algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102** expresa las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, PAT/*bar* y Vip3Aa19, para la detección de estas proteínas se pueden utilizar métodos de tira reactiva (LFS), los cuales están disponibles comercialmente. Adicionalmente, a nivel molecular se puede hacer una detección por medio de PCR en tiempo real, los métodos y *primers* específicos para efectuar la reacción de PCR para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 son **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 algodónero es muy baja.

1. Mecanismos de cruzamiento con especies del genero *Gossypium*.

No existen especies sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*Gossypium hirsutum*) en el área de liberación propuesta. De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), se reportan las siguientes especies de *Gossypium* para la región Norte de México (Cuadro 53).



Cuadro 53. Especies de *Gossypium* reportadas en la literatura para el Norte de México.

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

Las especies silvestres reportadas para México son diploides ($2n=2x=26$) y, por lo tanto, son sexualmente incompatibles con el algodón cultivado *G. hirsutum* el cual es una especie alotetraploide ($2n=4x=52$). En el caso de se pudieran encontrar especies silvestres cercanas a las regiones agrícolas y en el improbable caso de que pudieran quedar en contacto con polen de *G. hirsutum* (tetraploide), el producto de la fecundación sería triploide y durante la metafase de la meiosis no se podría realizar el apareamiento de homólogos, imposibilitando así la formación de un cigoto fértil por la disparidad de los sistemas genéticos (Stewart, 1995; Wendel *et al.*, 2010; Kantartzi, 2010). A esta barrera genética se debe incluir la barrera temporal para el entrecruzamiento ya que no se presenta coincidencia en los períodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales. Por otra parte, la distribución de la especie alotetraploide *G. barbadense* se encuentra limitada principalmente al sureste de México lejos de las zonas productoras de algodón comercial en el norte de la República Mexicana.

2. Mecanismos necesarios para el intercambio genético.

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

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a todas las especies de *Gossypium* que no se requiere repetir para cada taxón. Todas las especies de *Gossypium* presentan autopolinización aunque pueden presentarse ciertos cruzamientos intra específicos y posiblemente inter específicas mediados por insectos. El transporte del polen por el viento en el género *Gossypium* nunca se ha reportado lo cual es explicado por la textura y consistencia del polen producido en la antesis. El polen de *G. hirsutum* es viable por no más de 24 horas. Cada flor, como las todos los miembros de Malvaceae, son receptivas únicamente el día en que abren.

Para que sea considerada la posibilidad de hibridación entre algodón cultivado y especies silvestres de *Gossypium* se tienen que cumplir con requisitos de presencia y compatibilidad sexual y genética.



Once especies diploides de *Gossypium* se presentan en México como parte de la vegetación natural. Todas las especies se agrupan taxonómicamente en el mismo subgénero (Houzingenia) y pertenecen al grupo cromosómico del genoma D, al igual que uno de los subgenomas del algodón tetraploide cultivado. Sin embargo las especies son divergentes y por lo mismo se agrupan en 2 Secciones y 4 Subsecciones dentro de la clasificación genérica de *Gossypium* (Fryxell, 1992).

Las dos especies tetraploides de las que se han derivado cultivares de utilización agrícola, *G. hirsutum* y *G. barbadense* se presentan en México fuera de las áreas de producción comercial. La distribución de *G. barbadense* está generalmente limitada a los Estados del sureste. Desde un punto de vista práctico, *G. hirsutum* es de distribución más amplia y cualquier consideración aplicable a uno es también aplicable al otro (Fryxell, 1992; Palomo, 1996; Ulloa *et al.*, 2006).

3. Vigor de híbridos interespecíficos y fertilidad.

El embrión del híbrido que se pudiera formar entre un algodón cultivado tetraploide y un pariente silvestre diploide depende fuertemente de dos factores: el vigor vegetativo y la fertilidad de la planta. *Gossypium davidsonii* y tal vez *G. gossypoides* pueden ser eliminados en la producción de híbridos con el algodón cultivado debido a la letalidad complementaria.

Los híbridos interespecíficos entre las otras especies diploides y el algodón tetraploide se puede asumir que son viables y de crecimiento vegetativo relativamente vigoroso, con base en observaciones de híbridos obtenidos cuando el algodón (*G. hirsutum*) funcionó como parental hembra. Es decir, pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando es polinizado con el polen del algodón tetraploide. Más allá de la alopatría y los diferentes niveles de incompatibilidad sexual, el principal mecanismo de aislamiento entre el algodón (*G. hirsutum*) y sus parientes silvestres diploides es la diferencia que existe en el nivel de ploidía. Aunque el algodón cultivado tetraploide ($2n = 4x = 52$) posee un subgenoma cercano a las especies diploides de *Gossypium* de México ($2n = 2x = 26$), los híbridos interespecíficos entre el algodón y estas especies son triploides ($3x = 39$). Las plantas híbridas triploides usualmente desarrollan terminaciones florales pero no forman polen viable debido a que los pares están desbalanceados y a la segregación de los cromosomas. En los híbridos (DxAD), los cromosomas podrían estar en pares, recombinarse y segregarse muy cercanos a las proporciones teóricas, sin embargo, en los híbridos triploides DAD, los cromosomas 13 del subgenoma A son impares, por lo tanto, segregan aleatoriamente entre las dos células hijas en la Anafase I.

En la evolución de las plantas la ploidía se ha incrementado a partir de tales hibridaciones y se ha establecido que el *Gossypium* tetraploide (algodón) se originó de esta manera. En este caso el nivel de ploidía de ambos parentales (genomas A y D) podría haber sido el mismo. Mientras la posibilidad existe, las observaciones empíricas indican que el proceso en *Gossypium* es extremadamente raro, y de hecho, ejemplificado solamente por una ocurrencia.

Todas las especies conocidas de *Gossypium* diferentes a las 5 tetraploides poseen el mismo número de cromosomas ($n=13$). No se ha generado en la naturaleza otra ploidía en *Gossypium* que haya sobrevivido hasta nuestros días. Esto es particularmente importante para México debido a que las especies de *Gossypium* tetraploides y diploides han coexistido por más de un millón de años (Wendel, 1989) y no se tienen registros de la presencia de especies hexaploides.

En las principales regiones donde se cultiva algodón en el mundo, la mayor abundancia corresponde a *Gossypium hirsutum*. Esto se debe principalmente a que las variedades de *G. hirsutum* están adaptadas para obtener producciones más altas en climas templados que las



variedades de *G. barbadense*, las cuales presentan una mejor adaptación a las regiones secas del mundo. Las variedades comerciales de *G. barbadense* se cultivan por la alta calidad de la fibra que producen, misma que se utiliza para confeccionar hilados de marca (ejemplo: algodón Pima).

Las variedades modernas de *G. barbadense* y *G. hirsutum* están altamente domesticadas y contienen un mapa génico muy conservado (genoma AADD), y no es de sorprender que las propiedades nutritivas y físicas de las semillas de cada una de las especies de algodón se traslapen (Percy *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 2001).

Además, *G. barbadense* y *G. hirsutum* son sexualmente compatibles, y los elementos de cada especie se han introgresado a las variedades comerciales de algodón que se han desarrollado en base a las preferencias de los fitomejoradores (Percival *et al.*, 1999).

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

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

De acuerdo a algunas clasificaciones para la delineación de las especies, *G. barbadense* y *G. hirsutum* podrían ser clasificadas como sub-especies o variantes de una misma especie y no como especies separadas. La identidad de los progenitores de *G. hirsutum* y de *G. barbadense* permanece de alguna manera incierto (Brubaker *et al.*, 1999), pero mantienen su clasificación como especies separadas.

Las especies tetraploides ($2n = 4x = 52$) incluyendo a *G. hirsutum*, *G. barbadense* y *G. tomentosum* contienen los genomas nucleares A y D (AADD) y únicamente el genoma A cloroplástico, indicando que la semilla parental de la hibridación original fue de descendencia Africana o del Medio Este (Percival *et al.*, 1999).

Los datos moleculares indican que *G. hirsutum* y *G. barbadense* comparten un ancestro común (Brubaker *et al.*, 1999) con un tiempo para la formación de poliploidía de entre uno y dos millones de años. La mayoría de los investigadores considera que el donador del genoma A es *G. herbaceum* y el donador del genoma D a *G. raimondii* Ulbrich, o al menos los progenitores de estas dos especies. De esta manera *G. hirsutum* y *G. barbadense* contienen el mismo conjunto de genomas poliploides, el cual es genéticamente distinto de la mayoría de las especies no cultivadas de *Gossypium*.

Entre los algodones cultivados, *G. hirsutum* y *G. barbadense* (esto también incluye a las especies diploides *G. arboreum* y *G. herbaceum*), la introgresión para obtener una ploidía diferente o tipo de genoma es común históricamente debido a la expansión del rango de distribución natural del algodón ocasionado por la intervención humana y su cultivo.



El intercambio interespecífico de genes es responsable de parte de la diversidad genética que se encuentra dentro de cada especie cultivada (Brubaker *et al.*, 1999). Los cultivares modernos de *G. barbadense* se encuentran altamente introgresados con *G. hirsutum* (Percival *et al.*, 1999). Las características introgresadas entre *G. hirsutum* and *G. barbadense* se han mantenido mediante la selección de las características agronómicas y de productividad comercial (Wang *et al.*, 1995; Brubaker *et al.*, 1999). Por ejemplo, la introducción y adopción exitosa de cultivares de *G. barbadense* en los campos de producción de los Estados Unidos ha dependido de la introgresión de la característica de fotoperiodo de día corto de *G. hirsutum* a *G. barbadense* (Brubaker *et al.*, 1999).

Como se discutió con anterioridad, la introgresión natural y por intervención humana ha ocurrido entre *G. hirsutum* y *G. barbadense* (Brubaker *et al.*, 1993; Percy & Wendel, 1990; Brubaker & Wendel, 1994; Wendel & Albert 1992), y se presenta un contenido significativo de ADN de *G. hirsutum* en el genoma de *G. barbadense* (Wang *et al.*, 1995). Sin embargo, se espera que el intercambio genético natural entre las especies sea reducido en comparación con el que ocurre dentro de la misma especie (Wendel & Albert 1992).

La compatibilidad sexual entre *G. hirsutum* y *G. barbadense* es ampliamente aceptada, y existen varias publicaciones que proporcionan datos donde establecen que las dos especies pueden ser cruzadas para producir descendencia F₁ fértil que presenten una meiosis regular (Webber, 1934; Webber, 1935; Webber, 1939; Skovsted, 1937). No obstante, como es de esperarse, ciertas características fenotípicas se segregarán de manera constante ya sea hacia uno u otro fenotipo parental, por ejemplo:

Kohel *et al.* (1965) investigaron la genética de la floración de híbridos interespecíficos de *G. hirsutum* y *G. barbadense* cruzando variedades de día corto de *hirsutum* y *barbadense* con variedades de día neutro de *barbadense* e *hirsutum*, respectivamente. El control monogénico de la floración en *barbadense* no se expresó, mientras que el control multigénico de la floración similar al encontrado en *hirsutum* predominó en la progenie de la cruce interespecífica *hirsutum-barbadense*.

Jiang *et al.* (2000) investigaron el papel de las interacciones multilocus en la restricción de introgresión entre las dos especies poliploides *G. hirsutum* y *G. barbadense*. Después de tres generaciones de retrocruzas con *G. hirsutum*, los autores encontraron diferencias en la cromática de *G. barbadense*. De hecho, no había alelos de *G. barbadense* en alrededor del 30% de los *loci* bajo estudio, y siete regiones cromosómicas independientes de *G. barbadense* estaban totalmente ausentes. Debido a que los genomas de estas dos especies parecen ser colineales, los autores concluyeron que interacciones genéticas desfavorables en ciertos genotipos de híbridos protegen estas regiones del genoma de *G. hirsutum* de la introgresión. Probablemente *G. hirsutum* tiene “mejores” alelos para estas regiones provocando la pérdida selectiva de los alelos de *G. barbadense*.

i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.

- Artim, L., Hill, K., Jiang, X., Lee, M., Mascarenhas, V., Mullins, M., . . . Zawodny, J. (2003). *Petition for the determination of non-regulated status: lepidopteran insect protected VIP3A cotton transformation event COT102*. Research Triangle Park, N.C.: Syngenta Seeds, Inc.
- Baker, H. (1965). Characteristics and modes of origin of weeds. En H. Baker, & G. Stebbins, *The Genetics of Colonizing Species* (págs. 147-172). New York: Academic Press.



- Betz, F., Hammond, B., & Fuchs, R. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*: protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 156-173.
- Brubaker, C., & Wendel, J. (1994). Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*: Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Amer. J. Bot.*, 81, 1309-1326.
- Brubaker, C., Koontz, J., & Wendel, J. (1993). Bidirectional cytoplasmic and nuclear introgression in the New World cottons, *Gossypium barbadense* and *G. hirsutum* (Malvaceae). *Amer. J. Bot.*, 80, 1203-1208.
- Brubaker, C., Paterson, A., & Wendel, J. (1999). Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *Genome*, 42, 184-203.
- Carpenter, J., Felsot, A., Goode, T., Hammig, M., Onstad, D., & Sankula, S. (2002). *Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops*. Ames, IA: Council for Agricultural Science and Technology.
- Chapman, K. (2015). *Agronomic Assessment of GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 Cotton – Grown in the USA during 2013*. Morrisville, NC, USA: Bayer CropScience LP.
- Chapman, K., Wu, A., & Gao, Y. (2014). *Chapman, K.B.; Wu, A.J.; Gao, Y. 2014. GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 Cotton- Production and Protein Expression Analyses of Field Samples Grown in the USA during 2013*. Morrisville, N.C.: Bayer CropScience LP.
- Delaney, B., Astwood, J., Cunny, H., Conn, R., Herouet-Guicheney, C., MacIntosh, S., . . . Levine, M. (2008). Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and Chemical Toxicology*, 46, S71–S97.
- Fryxell, P. (1992). A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedea*, 2, 108–165.
- Habex, V. (2006). *Structural stability analysis of Gossypium hirsutum transformation event GHB614*. Gent, Belgium: Bayer BioScience N.V.
- Haelterman, S. (2009). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event T304-40*. Protocol PGS0491. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Hamilton, K., Goodman, R., & Fuchs, R. (2002). Safety assessment of insect-protected cotton. En J. Thomas, & R. Fuchs, *Biotechnology and safety assessment* (Third ed.). St. Louis, MO: Academic Press-Elsevier Science.
- Health-Canada. (2013). *Health Canada's Position on Highly Refined Oils Derived from Food Allergen Sources*. Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch.
- Hérouet, C., Esdaile, D., Mallyon, B., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., . . . 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*, 134–149.
- Herouet-Guicheney, C., Rouquié, D., Freyssinet, M., Currier, T., Martone, A., Zhou, J., . . . Rouan, D. (2009). Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54, 143-153.
- ILSI. (2011). *Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ab*. Washington D.C. USA.: Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation.
- ILSI. (2012). *Revisión de la seguridad ambiental de Vip3Aa*. Washington, D.C., USA: Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation.
- Jiang, C., Wright, R., Woo, S., DelMonte, T., & Peterson, A. (2000). QTL analysis of leaf morphology in tetraploid *Gossypium* (cotton). *Theor. Appl. Genet.*, 100, 409-418.



- Kanobe, C. (2014). *Comparative evaluation of the germination potential of GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 and FM966 cotton*. Research Triangle Park, NC: Bayer CropScience LP.
- Kantartzi, S. (2010). Hybridization barriers between cotton (*Gossypium hirsutum*) and species of the Malvaceae family. En B. Kaiser, *Pollen: structure, types and effects* (págs. 305-315). New York: Nova Science Publishers.
- Koch, M., Ward, J., Levine, S., Baum, J., Vicini, J., & Hammond, B. (2015). The food and environmental safety of Bt crops. *Front Plant Sci.*, 29(6), 283.
- Kohel, R., Lewis, C., & Richmond, T. (1965). The genetics of flowering response in cotton. V. Fruiting behavior of *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* in interspecific hybrids. *Genetics*, 51, 601-604.
- McClintock, J., Schaffer, C., & Sjoblad, R. (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.*, 45, 95–105.
- Mertens, K., & Moens, S. (2008). *Structural stability analysis of Gossypium hirsutum transformation event T304-40 over different generations, in different backgrounds and grown in different environments*. Gent, Belgium: Bayer BioScience N.V.
- Morishita, D. (2012). *What makes a weed a weed*. Weed Science Society of America (WSSA). www.wssa.net.
- OECD. (2008). *Consensus document on the biology of cotton (Gossypium spp.)*. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 45. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Ueda, M., Ozeki, Y., & Hirose, M. (2008). Evaluation of subchronic toxicity of dietary administered Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* var. Kurustaki HD-1 in F344 male rats with chemically induced gastrointestinal impairment. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2184–2189.
- Palomo, A. (1996). Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 4, 359-369.
- Peeters, K. (2014). *Structural stability analysis of Gossypium hirsutum GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102*. Study Number BBS13-031. Gent, Belgium: Bayer CropScience N.V.
- Percival, A., Wendel, J., & Stewart, J. (1999). Cotton: origin, history, technology, and production. En W. Smith, *Cotton: origin, history, technology, and production* (págs. 33–63). Wiley, New York.
- Percy, R., & Wendel, J. (1990). Allozyme evidence for the origin and diversification of *Gossypium barbadense*. *Theor. Appl. Genet.*, 79, 529-542.
- Percy, R., Calhoun, M., & Kim, H. (1996). Seed gossypol variation within *Gossypium barbadense* L. cotton. *Crop Science*, 36, 193–197.
- Robinson, A., Bowman, D., Cook, C., Jenkins, J., Jones, J., May, O., . . . Stewart, J. (2001). Nematode Resistance. En T. Kirkpatrick, & C. Rothrock, *Compendium of cotton diseases* (Second Edition ed., págs. 68–72). St. Paul, MN: APS Press.
- Rouquie, D. (2007). *Cry1Ab protein. Acute toxicity by oral gavage in mice*. Sophia Antipolis Cedex, France: Bayer CropScience.
- Scott, A., Bushey, D., Freyssonnet, M., Poe, M., & Rinehardt, M. (2008). *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-GHØØ. Research Triangle Park, NC, USA: BayerCropScience LP.
- Sims, S., Berberich, S., Nida, D., Segalini, L., Leach, J., Eber, C., & Fuchs, R. (1995). Analysis of Expressed Proteins in Fiber Fractions from Insect-Protected and Glyphosate-Tolerant Cotton Varieties. *American Society of Agronomy*, 36(5), 1212-1216.
-



- Sjogblad, R., McClintock, J., & Engler, R. (1992). Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 1, 3-9.
- Skovsted, A. (1937). Cytological studies in cotton IV. Chromosome conjugation in interspecific hybrids. *J. Genet.*, 34, 95-134.
- Smith, C., Cantrell, R., Moser, H., & Oakley, S. (1999). History of Cultivar Development in the United States. En C. Smith, & J. Cothren, *Cotton: Origin, History, Technology, and Production* (págs. 99–171). New York.: John Wiley & Sons.
- Stewart, J. (1995). Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. En C. Git, & N. Forrester, *Proc. World Cotton Research Conference* (págs. 313-327). Melbourne: CSIRO .
- Strickberger, & M.W. (1976). *Genetics, 2nd Ed. Chapter 8. Probability and Statistical Testing*. New York: Macmillan Publishing Co., Inc.
- Totis, M. (2015). *Cry2Ae protein. Acute toxicity study by oral gavage in mice*. Sophia Antipolis Cedex, France: Bayer CropScience.
- Ulloa, M., Stewart, J., Garcia, E., Godoy, A., Gaytan, M., & Acosta, N. (2006). Cotton genetics resources in the western states of Mexico: in situ conservation status and germplasm collection for ex situ preservation. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 53 653-668.
- USEPA. (2008). *Bacillus thuringiensis modified Cry1Ab (SYN-IR67B-1) and Vip3Aa19 (SYN-IR102-7) insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in COT102 X COT67B cotton*. Washington, D.C.: www.epa.gov/oppbppd1/.
- Vanhoutte, N. (2014). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event COT102. Protocol MDP1949 + MDP1177*. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Vanhoutte, N. (2014). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event GHB119. Protocol PGS0489 + PGS0477*. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Vanhoutte, N. (2014). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event GHB614. Protocols PGS0486 + PGS0477*. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Verhaeghe, S., & 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 BioScience N.V. Technologiepark 38, B-9052 Ge. Gent, Belgium: Bayer BioScience N.V.
- Wang, G., Dong, J., & Paterson, A. (1995). The distribution of Gossypium hirsutum chromatin in G. barbadense germ plasm: molecular analysis of introgressive plant breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 1153-1161.
- Webber, J. (1934). Cytogenetic notes on cotton and cotton relatives. *Science*, 21, 268-269.
- Webber, J. (1935). Interspecific hybridization in Gossypium and the behavior of F1 plants. *J. Agric Res.*, 51, 1047-1070.
- Webber, J. (1939). Relationships in the genus Gossypium as indicated by citological data. *J. Agric. Res.*, 58, 237-261.
- Wendel, J. (1989). New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 86(11), 4132–4136.
- Wendel, J., & Albert, V. (1992). Phylogenetics of the cotton genus (Gossypium): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Syst. Bot.*, 17, 115-143.
- Wendel, J., Brubaker, C., & Seelanan, T. (2010). The origin and evolution of Gossypium. En J. Stewart, D. Oosterhuis, J. Heitholt, & J. Mauney, *Physiology of cotton* (págs. 1-18). New York: Springer.



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

Las medidas y procedimientos de monitoreo que se indican a continuación tienen el objetivo de asegurar que el algodón GlyTol® TwinLink™ Plus será manejado de manera responsable durante todo el proceso de liberación al ambiente, el cual incluye actividades relativas al transporte, almacenamiento, manejo, evaluación y disposición final del material genéticamente modificado.

1. Plan de monitoreo detallado.

El plan de monitoreo del algodón GlyTol® TwinLink™ Plus antes de la liberación estará enfocado en las siguientes actividades:

- Obtención del Permiso de Liberación al Ambiente (PLA) correspondiente.
- Análisis del PLA y de las Medidas de bioseguridad establecidas en el mismo.
- Elaboración de convenio de investigación entre Bayer de México, S.A. de C.V. y una Institución de Investigación pública que será responsable del ensayo.
- Importación y almacenaje de la semilla en instalaciones de Bayer.
- Movilización de la semilla al sitio de liberación previamente seleccionado y autorizado.
- Capacitación en el cumplimiento de medidas de bioseguridad y *stewardship* a todo el personal involucrado en la liberación (investigadores, técnicos, agricultores).

1.1. Obtención del Permiso de Liberación al Ambiente (PLA).

Antes de comenzar cualquier actividad relacionada con el algodón GlyTol® TwinLink™ Plus se deberá contar con el permiso de liberación al ambiente (PLA), otorgado para la tecnología, regiones y ciclo agrícola solicitado.

1.2. Análisis de medidas de bioseguridad y condicionantes.

Una vez obtenido el PLA se realizará una revisión de las medidas de bioseguridad y condicionantes establecidas por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y la Dirección General de Impacto y Riesgo Ambiental (DGIRA), para realizar ajustes en el protocolo de evaluación en caso que derivado del análisis así se requiera y de esta manera dar cumplimiento a lo establecido en el permiso.

1.3. Convenio de investigación.

Como se menciona en el documento **WI-RCM-001 Realización de ensayo de campo (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**, es necesario que se establezca un convenio de colaboración entre Bayer de México, S.A. de C.V. y un proveedor, que en este caso es una Institución de Investigación Pública (INIFAP, Universidades, etc.) antes de realizar la evaluación de la tecnología.



Si el proveedor elegido no ha sido evaluado previamente, se lleva a cabo la evaluación del proveedor de acuerdo al **SOP-SGC-011 Selección y Evaluación de Proveedores** y a la **GPS 12.07. Evaluation of Third Parties, Acquisitions, and Countries of Operation**. Si la evaluación resulta nivel 3 se lleva a cabo una visita al proveedor y se pide una carta de recomendación a otros clientes, para tener el respaldo suficiente de realizar trabajos con él. Una vez que se ha elegido el centro de investigación se establece contacto con el investigador experto en el tema.

1.4. Importación y almacenaje de la semilla.

La importación de la semilla se realizará siguiendo el procedimiento establecido en el documento **SOP-IMM-001 Importación de semilla** **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**, en dónde se describe la metodología, evaluación y los controles del proceso de importación.

- Una vez que se cuenta con el permiso de liberación al ambiente correspondiente, se consulta el Modulo de Requisitos Fitosanitarios (<http://www.senasica.gob.mx/?id=5145>) y se imprimen las Medidas Fitosanitarias de Importación (MFI) de acuerdo al tipo de producto, origen y procedencia del mismo. A la par de lo anterior, el departamento de Comercio Internacional deberá de realizar la “solicitud del trámite de importación SENASICA” en la VU - Ventanilla única (<http://www.ventanillaunica.gob.mx/>).
- Posteriormente se informa de la importación de la semilla de acuerdo al registro **RG-CMM-003 Plan de importación**. Una vez iniciadas las importaciones se hace un monitoreo de las cantidades y lotes a través del registro **RG-CMM-022 Variedades por número de lote**.
- Una vez que se cuenta con la liberación de importación el Departamento de Logística coloca la orden de compra (*Purchase Order*) para el país exportador en SAP²⁹.
- Una vez que se cuenta con el permiso de siembra y el Certificado de Importación generado a través de la VU - Ventanilla única (<http://www.ventanillaunica.gob.mx/>), el Departamento de Comercio Internacional comienza el proceso de importación. De igual manera, realiza la liberación y el envío a la Aduana correspondiente de la cantidad de semilla solicitada, acompañando el embarque con la documentación necesaria y la establecida en la MFI.
- El Departamento de Comercio Internacional a través del Agente Aduanal contratado para tal fin, realiza la liberación de la semilla de la aduana; en caso de cualquier contratiempo o que se requiera algún tipo de aclaración, el Coordinador responsable del Dpto. de Comercio internacional lo comunicará inmediatamente a la Gerencia de Negocio y Asuntos Regulatorios, en caso de ser necesaria documentación adicional ésta será provista por la gerencia correspondiente.

²⁹ SAP (Sistemas, Aplicaciones y Productos) es un sistema de gestión de recursos empresariales que integran muchas o todas las funciones de la empresa como finanzas, planificación, costos, comercial, mercadeo, manufactura, logística, mantenimiento, control de calidad y Recursos Humanos.



- Una vez liberada la semilla de la aduana esta se envía al almacén de Bayer ubicado en Delicias, Chih. Cuando la semilla llega a su destino, el responsable del almacén revisa el embarque y procede a darle ingreso en el sistema SAP y en físico.
- El almacenamiento se realiza siguiendo las acciones establecidas en el documento **WI-RCM-002 Etiquetado y almacenamiento de muestras de semilla regulada**, cuyo propósito es instruir a las personas involucradas sobre el correcto almacenamiento e identificación de materiales, así como cumplir con la directriz **GPS 12.01 Preservation of Product Genetic Integrity and Traceability of Seeds and Traits**.
 1. Después de que la semillas son ingresadas a la bodega se deberá proceder a actualizar los respectivos inventarios, tomando el peso bruto del material que ingresa, el estado del paquete y la persona que lo hace.
 2. Los materiales a utilizar con fines experimentales deberán ser almacenados en un lugar separado, con acceso restringido y bajo llave e indicando claramente: semilla regulada, la variedad, el evento, el lote. Los materiales no experimentales podrán ser almacenados en el mismo sitio donde se tienen convencionales, pero separados y correctamente identificados.
 3. Las personas autorizadas para ingresar a la bodega deberán llenar el formato de registro de entrada y salida de personal e indicar el motivo.
 4. Cada vez que se realicen ingresos y salidas de semillas de bodega, se deberá actualizar en el sitio de *SharePoint* correspondiente indicando las cantidades que se retiran, destino y la persona que retira.
 5. La identificación de las semillas deberá tener como mínimo los siguientes datos, dependiendo del tipo de semilla genéticamente modificada o convencional (
6.
7.
8. **Figura 114**).
 9. El anterior rótulo deberá colocarse a cada uno de los materiales de semillas existentes en la bodega, con la suficiente protección a fin de que se preserven estos datos durante el tiempo necesario en bodega.



Figura 114. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.

 <p>Science For A Better Life</p> <p>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</p> <p>SEMILLA GENÉTICAMENTE MODIFICADA</p> <p>SEMILLA DE [Cultivo (<i>Nombre científico</i>)] VARIEDAD/ CÓDIGO:</p> <p>Tecnología: <u>XXXXXXXXXX</u> Pais de origen: <u>XXXXXXXXXX</u> Evento: <u>XXXXXXXXXX</u> Identificador OCDE: <u>XXXXXXXXXX</u> Contenido neto (kg):</p> <p>No. de lote:</p> <p>Fecha de ingreso a bodega:</p> <p>ADVERTENCIA: ESTA SEMILLA HA SIDO TRATADA CON PLAGUICIDAS, por lo tanto:</p> <p>"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"</p> <p>PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE BIOSEGURIDAD</p> <p>"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" "Esta semilla no está destinada para consumo"</p> <p>"En caso de liberación accidental, repórtelo a: libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx C.P. 04100, Tel. +52 (55) 50903000 Ext. 51533</p> <p>Centro de Atención Telefónica. 018002293772 LADA sin costo.</p> 	 <p>Science For A Better Life</p> <p>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</p> <p>SEMILLA CONVENCIONAL</p> <p>SEMILLA DE [Cultivo (<i>Nombre científico</i>)] VARIEDAD/ CÓDIGO:</p> <p>Tecnología: <u>NA</u> Pais de origen: <u>XXXXXXXXXX</u> Evento: <u>NA</u> Identificador OCDE: <u>NA</u> Contenido neto (kg):</p> <p>No. de lote:</p> <p>Fecha de ingreso a bodega:</p> <p>ADVERTENCIA: ESTA SEMILLA HA SIDO TRATADA CON PLAGUICIDAS, por lo tanto:</p> <p>"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"</p> 
--	--

1.5. Movilización de la semilla.

La semilla saldrá del almacén sólo cuando Bayer lo autorice y será transportada vía terrestre al sitio de liberación, siguiendo las recomendaciones del documento **RG-ARC-012 Registro de transporte de semillas reguladas**.

Una vez que la semilla sea entregada al investigador responsable con quien Bayer tenga un convenio de colaboración vigente, se procederá a revisar el inventario de semilla y firmar de recibido si las cantidades despachadas coinciden con las cantidades entregadas.

En caso de liberación accidental de material de algodón genéticamente modificado durante el transporte, se notificará al correo libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx, dentro de las 24



horas siguientes que se tenga conocimiento de la misma, e informará de manera oficial en un periodo de 3 días hábiles a la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP) y a la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) de la situación, así mismo, Bayer de México implementará inmediatamente las siguientes acciones:

- Georreferenciar el sitio de la liberación accidental y delimitar el área de dispersión.
- Recuperar toda la semilla que sea posible.
- Realizar un balance entre la semilla transportada y la semilla recuperada para conocer la cantidad de semilla no recuperada y documentarlo.
- Recabar evidencia fotográfica del sitio de liberación y del material liberado.
- Establecer un programa de monitoreo de plantas voluntarias en el sitios de liberación.
- Eliminación de plantas voluntarias de manera manual o mediante el uso de herbicidas.
- Entregar un reporte al SENASICA con la documentación de las actividades realizadas.

1.6. Capacitación en el cumplimiento de medidas de bioseguridad y *stewardship*.

Todas las personas involucradas en la liberación y seguimiento del algodón GlyTol® TwinLink™ Plus serán capacitadas antes del establecimiento de los ensayos con el fin de que conozcan las implicaciones y responsabilidades que conlleva la utilización de organismos genéticamente modificados bajo el contexto de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Las capacitaciones se enfocarán en:

- Biotecnología vegetal.
- Características de la tecnología GlyTol® TwinLink™ Plus.
- Acciones en materia de bioseguridad.
- Responsabilidades individuales de los involucrados.
- Riesgos a la sanidad vegetal por el uso de OGM's.
- Áreas Naturales Protegidas y sitios Ramsar.
- Lineamientos de *Stewardship*.

Posterior a la capacitación se hará un registro de los asistentes y los capacitadores mediante un formato de lista de asistencia.

El plan de capacitaciones a realizar en 2016 se presenta a continuación.

Grupo a capacitar	Responsable de la capacitación	Fecha de la capacitación
Investigadores responsables	Personal de Asuntos Regulatorios de Bayer	3ª y 4ª semana de Marzo 2016
Personal asistente de los investigadores	Investigadores responsables y Personal de Asuntos	3ª y 4ª semana de Marzo 2016



	Regulatorios de Bayer.	
--	------------------------	--

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

El plan de monitoreo del algodón GlyTol® TwinLink™ Plus durante y posterior a la liberación estará enfocado en las siguientes actividades:

- Limpieza del equipo a utilizar (sembradora, tractor) antes y después de la siembra.
- Siembra del predio de acuerdo a la distribución indicada en el croquis del protocolo, identificando debidamente los diversos tratamientos, controles, etc.
- Evaluación de las variables indicadas en el protocolo.
- Entrada al predio restringida al personal autorizado por Bayer.
- Auditorías internas por personal de Asuntos Regulatorios de Bayer.
- Auditorías internas por personal de *Stewardship* de Bayer.
- Visitas de inspección por personal de la Dirección de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (DBOGM) del SENASICA.
- Destrucción de todo el material vegetal y producto de la cosecha, una vez concluido el ensayo.
- Limpieza del equipo a utilizar (cosechadora, desvaradora, rastra) posterior a la destrucción del ensayo.
- Monitoreo y destrucción de plantas voluntarias dentro del predio y en los bordes durante un ciclo posterior a la cosecha.

2.1. Siembra del ensayo.

Previamente a la siembra del ensayo, se realiza la elección del sitio de liberación, el cual deberá cumplir con una serie de requisitos que lo hagan apto para la siembra y que permitan dar cumplimiento a las Medidas de Bioseguridad establecidas en el permiso:

- Ubicarse en la ecorregión Nivel IV autorizada en el permiso de liberación al ambiente.
- Ubicarse a una distancia mínima de 100 metros respecto a las poblaciones silvestres de algodón.
- Ubicarse a una distancia mínima de 1000 metros respecto a cualquier Área Natural Protegida.
- Localizarse fuera de humedales de importancia internacional (sitios Ramsar).

La siembra del ensayo será realizada por personal de Bayer y el investigador responsable, de acuerdo con la distribución indicada en el croquis del protocolo, identificando debidamente los tratamientos y controles a evaluar.

El manejo agronómico del ensayo deberá ser realizado de acuerdo con las prácticas regionales y recomendaciones realizadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de cada región.

En el [Cuadro 54](#) se presenta el manejo agronómico del algodón en Chihuahua y la Comarca Lagunera, desarrollado como parte del paquete tecnológico del cultivo (Quiñonez *et al.*, 2015). De



igual manera, en el Cuadro 55 puede observarse el manejo agronómico del cultivo de algodón en el Estado de Tamaulipas (Gallardo *et al.* 2015; Salgado y Silguero, 1997).

Cuadro 54. Manejo agronómico del cultivo de algodón en Chihuahua - Comarca Lagunera.

Prácticas agronómicas	GlyTol™ TwinLink™ Plus	Convencional
Preparación del terreno		
Subsuelo	Esta práctica deberá hacerse en aquellos terrenos de suelo medio y pesado con piso de arado, de preferencia cada dos años y a una profundidad de 50 cm como medida para lograr una mayor penetración del aire y del agua de riego a la zona radicular de la planta	Esta práctica deberá hacerse en aquellos terrenos de suelo medio y pesado con piso de arado, de preferencia cada dos años y a una profundidad de 50 cm como medida para lograr una mayor penetración del aire y del agua de riego a la zona radicular de la planta
Barbecho	Inmediatamente después de la cosecha anterior. Se sugiere un barbecho de 30 a 40 cm de profundidad	Inmediatamente después de la cosecha anterior. Se sugiere un barbecho de 30 a 40 cm de profundidad
Rastreo	Inmediatamente después del barbecho	Inmediatamente después del barbecho
Nivelación	Esta práctica facilita la aplicación uniforme de los riegos, y evita los encharcamientos que causan pudriciones a la semilla o a las plántulas	Esta práctica facilita la aplicación uniforme de los riegos, y evita los encharcamientos que causan pudriciones a la semilla o a las plántulas
Labores de cultivo		
Época de siembra	Comarca: 20 de marzo - 20 de abril, Chihuahua: 1 de abril - 25 de mayo La germinación y emergencia del algodón se ven favorecidas cuando las temperaturas del suelo al momento de la siembra son iguales o mayores a 18°C	Comarca: 20 de marzo - 20 de abril, Chihuahua: 1 de abril - 25 de mayo La germinación y emergencia del algodón se ven favorecidas cuando las temperaturas del suelo al momento de la siembra son iguales o mayores a 18°C
Método de siembra	Siembra en húmedo o a "tierra venida" (riego de pre-siembra para sembrar con el suelo a capacidad de campo óptima)	Siembra en húmedo o a "tierra venida" (riego de pre-siembra para sembrar con el suelo a capacidad de campo óptima)
Densidad de siembra	17 kg/ha para una población objetivo entre 100,000 a 150,000 plantas/ha	17 kg/ha para una población objetivo entre 100,000 a 150,000 plantas/ha
Riegos	Cinco riegos de auxilio en las etapas fenológicas de: inicio de floración, máxima producción de botones e inicio de capullos. Calendario de riego a los 60, 80, 100 y 120 días; o bien a los 50, 70, 90, 110 y 130 días	Cinco riegos de auxilio en las etapas fenológicas de: inicio de floración, máxima producción de botones e inicio de capullos. Calendario de riego a los 60, 80, 100 y 120 días; o bien a los 50, 70, 90, 110 y 130 días
Fertilización	Al momento de la siembra e inmediatamente antes del primer riego de auxilio	Al momento de la siembra e inmediatamente antes del primer riego de auxilio
Control de malezas *	Control de maleza durante el periodo crítico de competencia mediante la aplicación de herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, complementado con labores culturales (escardas)	Control de maleza durante el periodo crítico de competencia mediante la aplicación de herbicidas pre-emergentes y post-emergentes, control manual y labores culturales (escardas)
Control de plagas		



Insectos lepidópteros *	Control mediante la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3A.	Aplicación de insecticidas.
Otras plagas (trips, chinches, mosquita blanca, etc.)	Aplicación de insecticidas.	Aplicación de insecticidas.
Cosecha		
Defoliación	Aplicar defoliante cuando la planta tenga 70% de bellotas abiertas	Aplicar defoliante cuando la planta tenga 70% de bellotas abiertas
Cosecha	Se recomienda efectuar la cosecha en forma mecánica, esta se debe realizar cuando el cultivo este completamente en capullo, ya que si se introduce antes la maquina pizcadora, el porcentaje de fibra se reduce y, además, habrá mayor manchado y entrelazado de la fibra lo que demerita su calidad	Se recomienda efectuar la cosecha en forma mecánica, esta se debe realizar cuando el cultivo este completamente en capullo, ya que si se introduce antes la maquina pizcadora, el porcentaje de fibra se reduce y, además, habrá mayor manchado y entrelazado de la fibra lo que demerita su calidad
Desvare	El desvare se debe efectuar inmediatamente después de la pizca, con el fin de destruir las bellotas que no logran abrir y así eliminar los individuos de picudo y gusano rosado que invernan en ellas	El desvare se debe efectuar inmediatamente después de la pizca, con el fin de destruir las bellotas que no logran abrir y así eliminar los individuos de picudo y gusano rosado que invernan en ellas

* Estas son las únicas prácticas que difieren en el manejo agronómico del algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus con relación al algodón convencional.

Cuadro 55. Manejo agronómico del cultivo de algodón en Tamaulipas.

Prácticas agronómicas	GlyTol™ TwinLink™ Plus	Convencional
Preparación del terreno		
Barbecho	Después del desvare, a una profundidad de 25-30 cm como mínimo, transversal al surcado anterior	Después del desvare, a una profundidad de 25-30 cm como mínimo, transversal al surcado anterior
Rastreo	20 a 30 días después del barbecho	20 a 30 días después del barbecho
Nivelación	Esta práctica facilita la aplicación uniforme de los riegos, y evita los encharcamientos que causan pudriciones a la semilla o a las plántulas	Esta práctica facilita la aplicación uniforme de los riegos, y evita los encharcamientos que causan pudriciones a la semilla o a las plántulas
Labores de cultivo		
Época de siembra	Tamaulipas Norte: 15 de febrero - 15 de marzo Tamaulipas Sur: 15 de junio - 25 de julio La germinación y emergencia del algodón se ven favorecidas cuando las temperaturas del suelo al momento de la siembra son iguales o mayores a 18°C	Tamaulipas Norte: 15 de febrero - 15 de marzo Tamaulipas Sur: 15 de junio - 25 de julio La germinación y emergencia del algodón se ven favorecidas cuando las temperaturas del suelo al momento de la siembra son iguales o mayores a 18°C
Método de siembra	Siembra a "tierra venida" (riego de pre-siembra para sembrar con el suelo a capacidad de campo óptima) a una profundidad de 5 – 7 cm	Siembra a "tierra venida" (riego de pre-siembra para sembrar con el suelo a capacidad de campo óptima) a una profundidad de 5 – 7 cm
Densidad de siembra	17 kg/ha para una población objetivo entre 100,000 a 150,000 plantas/ha	17 kg/ha para una población objetivo entre 100,000 a 150,000 plantas/ha



Riegos	Cuatro riegos: 15 días antes de la siembra, 45 días de nacidas las plantas (aparición de primeros cuadros), 65 días de nacidas (aparición de primeras flores) y 95 días de nacidas (primera bellota abierta)	Cuatro riegos: 15 días antes de la siembra, 45 días de nacidas las plantas (aparición de primeros cuadros), 65 días de nacidas (aparición de primeras flores) y 95 días de nacidas (primera bellota abierta)
Fertilización	Al momento de la siembra e inmediatamente antes del primer riego de auxilio	Al momento de la siembra e inmediatamente antes del primer riego de auxilio
Control de malezas *	Control de maleza durante el período crítico de competencia mediante la aplicación de herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, complementado con labores culturales (escardas)	Control de maleza durante el periodo crítico de competencia mediante la aplicación de herbicidas pre-emergentes y post-emergentes, control manual y labores culturales (escardas)
Control de plagas		
Insectos lepidópteros *	Control mediante la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3A.	Aplicación de insecticidas.
Otras plagas (trips, chinches, mosquita blanca, etc.)	Aplicación de insecticidas.	Aplicación de insecticidas.
Cosecha		
Defoliación	Aplicar defoliante cuando la planta tenga 70% de bellotas abiertas	Aplicar defoliante cuando la planta tenga 70% de bellotas abiertas
Cosecha	Se recomienda efectuar la cosecha en forma mecánica, esta se debe realizar cuando el cultivo este completamente en capullo, ya que si se introduce antes la maquina pizcadora, el porcentaje de fibra se reduce y, además, habrá mayor manchado y entrelazado de la fibra lo que demerita su calidad	Se recomienda efectuar la cosecha en forma mecánica, esta se debe realizar cuando el cultivo este completamente en capullo, ya que si se introduce antes la maquina pizcadora, el porcentaje de fibra se reduce y, además, habrá mayor manchado y entrelazado de la fibra lo que demerita su calidad
Desvare	El desvare se debe efectuar inmediatamente después de la pizca, con el fin de destruir las bellotas que no logran abrir y así eliminar los individuos de picudo y gusano rosado que invernan en ellas	El desvare se debe efectuar inmediatamente después de la pizca, con el fin de destruir las bellotas que no logran abrir y así eliminar los individuos de picudo y gusano rosado que invernan en ellas

2.2. Limpieza de maquinaria.

Toda la maquinaria utilizada en el ensayo deberá ser inspeccionada y limpiada para evitar que contenga semilla de otros materiales antes de realizar la siembra y una vez finalizada la actividad se deberá limpiar nuevamente para impedir que el material regulado sea trasladado accidentalmente fuera del sitio permitido.

La limpieza será realizada de manera manual, con aire comprimido o agua a presión y el material recuperado será destruido dentro del predio. Las actividades realizadas serán documentadas en el **Formulario de Inspección – Limpieza de maquinaria.**

2.3. Evaluación de la tecnología.

Durante el ensayo se evaluarán las variables descritas en el protocolo de ensayo experimental referentes a fenología, efectividad de la tecnología para el control de organismos blanco, efectividad de los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio y organismos no blanco.



2.4. Acceso al ensayo.

El acceso al ensayo estará restringido al personal de Bayer, investigadores responsables y equipo de trabajo, agricultores cooperantes y autoridades en materia de Bioseguridad que realicen visitas de inspección. En el caso de que personas no autorizadas ingresen al sitio de liberación, el investigador responsable notificará el hecho a Bayer, quien a su vez dará aviso al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) durante las 24 horas siguientes.

2.5. Auditorías internas de cumplimiento.

Durante el desarrollo del ensayo el personal de Asuntos Regulatorios de Bayer realizará visitas con el objetivo de asegurar que se cumplan las Medidas de Bioseguridad y condicionantes establecidas en el Permiso de Liberación al Ambiente. La información recabada durante las visitas será registrada en el **Formulario de Inspección – Ensayos de Campo Regulados**.

2.6. Auditorías internas de Stewardship.

Durante el desarrollo del ensayo el personal de *Stewardship* de Bayer realizará visitas con el objetivo de asegurar que aquellos quienes manipulan el algodón GlyTol® TwinLink™ Plus realicen una gestión responsable y un manejo adecuado del mismo. La información recabada durante las visitas será registrada en el **Formulario de Inspección – Ensayos de Campo Regulados**.

2.7. Visitas de Inspección de SENASICA.

Durante el desarrollo del ensayo el SENASICA podrá realizar visitas de inspección para verificar el cumplimiento de las Medidas de Bioseguridad y Condicionantes establecidas en el Permisos de Liberación al ambiente. Personal de Bayer y el Investigador responsable estarán presentes durante la actividad, para proporcionar la información y documentación que el inspector requiera y firmar el acta de visita de inspección resultante.

2.8. Destrucción del ensayo.

La destrucción del ensayo será realizada una vez que todas las evaluaciones sean concluidas. Las plantas de algodón completas, incluida la semilla y la fibra, serán cortadas a nivel del suelo y acomodadas en montones, los cuales serán destruidos mediante incineración.

2.9. Monitoreo de plantas voluntarias.

En el sitio de liberación se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias con el fin de detectar y destruir cualquier planta de algodón que pueda emerger posterior a la destrucción del ensayo. El monitoreo se realizará considerando los siguientes aspectos:

- El monitoreo será realizado en el sitio de liberación y en los bordes.
- Los recorridos de monitoreo se realizarán periódicamente.
- Se pondrá especial atención cuando las condiciones ambientales favorezcan la germinación de semillas (época de lluvias).



- Las plantas observadas serán destruidas de manera manual o mediante la aplicación de herbicidas.
- Se documentará el número de plantas destruidas y se elaborará un reporte de monitoreo.

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.

Como se describió anteriormente, se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias posterior a la destrucción del ensayo. El monitoreo se realizará en el sitio de liberación y en los bordes, para eliminar las plantas voluntarias de algodón en caso de que existan.

Los métodos de destrucción podrán variar dependiendo del número de plantas emergidas y se podrá optar por rastreo, uso herramientas como pico o pala, eliminación manual desenterrando las plantas y aplicación de herbicidas.

Las plantas voluntarias encontradas deberán eliminarse antes de que lleguen a la etapa de floración. La actividad será documentada mediante el **Formulario de Inspección – Monitoreo de plantas voluntarias**.

b) Medidas y procedimientos de bioseguridad.

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

La semilla de algodón a utilizar en la siembra del ensayo será transportada, almacenada y manejada de acuerdo a lo establecido en los documentos:

- WI-RCM-001 - Realización de ensayos de campo.
- SOP-SGC-011 - Selección y evaluación de proveedores.
- GPS 12.07 - Evaluation of third parties.
- SOP-IMM-001 - Importación de semilla.
- RG-CMM-003 - Plan de importación.
- RG-CMM-022 – Variedades por número de lotes.
- WI-RCM-002 - Etiquetado y almacenamiento de muestras de semillas.
- GPS 12.01 – Preservation of Product Integrity.
- RG-ARC-12 - Transporte de semilla regulada.
- Checklist de limpieza de maquinaria.
- Checklist de auditoria de ensayos de campo.
- Checklist de monitoreo de plantas voluntarias.
- Hoja de transporte de semilla.

Todos estos formqrts son considerados como **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

Posterior a la importación, la semilla será resguardada en el almacén de Bayer ubicado en la siguiente dirección:



Km 3 Carr. Panamericana Sur
S/N Sector Oriente
33019 Cd. Delicias, Chih.

Figura 115. Almacén de Bayer de México ubicado en Delicias, Chih.



Las medidas que se utilizan en el almacén para vigilar la semilla almacenada, son las siguientes:

- Control de inventario mediante el software modular para la gestión empresarial SAP®.
- Cámaras de seguridad en las afueras del almacén, conectadas a la compañía de seguridad.
- Sensores de movimiento en las afueras del almacén, conectadas a la compañía de seguridad.
- Circuito cerrado de video dentro del almacén.
- Monitoreo cada 15 días para comprobar que los sistemas de seguridad se encuentren en condiciones óptimas y funcionando.
- Señalamientos de seguridad.



Figura 116. Condiciones de almacenamiento y seguridad del almacén.





Como se mencionó anteriormente toda la semilla será etiquetada con la siguiente información.



Science For A Better Life

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

SEMILLA GENÉTICAMENTE MODIFICADA

SEMILLA DE [Cultivo (*Nombre científico*)] VARIEDAD/ CÓDIGO:

+ Tecnología: <u>XXXXXXXXXX</u> Evento: Identificador OCDE: <u>XXXXXXXXXX</u>	Pais de origen: <u>XXXXXXXXXX</u> Contenido neto (kg):
---	---

No. de lote:
Fecha de ingreso a bodega:

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”

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE BIOSEGURIDAD

“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”
“Esta semilla no está destinada para consumo”

“En caso de liberación accidental, repórtelo a:
libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx
C.P. 04100, Tel. +52 (55) 50903000 Ext. 51533

Centro de Atención Telefónica.
018002293772 LADA sin costo.

Antes del inicio de la temporada de siembra, la semilla será movilizada al sitio de liberación y entregada al investigador responsable para el establecimiento del ensayo. Las medidas de bioseguridad durante el transporte incluirán:

- La semilla será transportada en empaques de papel cartón resistentes a las maniobras.
- Se registrará la cantidad de semilla enviada, variedad y el tipo de empaque utilizado.
- Se registrará la cantidad de semilla recibida, variedad y condiciones del empaque utilizado.

En caso de liberación accidental de material de algodón genéticamente modificado durante el transporte, se notificará al correo libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx, dentro de las 24 horas siguientes que se tenga conocimiento de la misma y se informará de manera oficial en un periodo de 3 días hábiles a la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y



Pesquera y a la Dirección General de Sanidad Vegetal de la situación, así mismo, Bayer de México implementará inmediatamente las siguientes acciones:

- Georreferenciar el sitio de la liberación accidental y delimitar el área de dispersión.
- Recuperar toda la semilla que sea posible.
- Realizar un balance entre la semilla transportada y la semilla recuperada para conocer la cantidad de semilla no recuperada y documentarlo.
- Recabar evidencia fotográfica del sitio de liberación y del material liberado.
- Establecer un programa de monitoreo de plantas voluntarias en el sitios de liberación.
- Eliminación de plantas voluntarias de manera manual o mediante la aplicación de herbicidas.
- Entregar un reporte al SENASICA con la documentación de las actividades realizadas.

El ensayo de algodón se establecerá preferentemente en terrenos de un Centro de Investigación Pública que cuente con control de acceso a personal externo, para evitar la entrada de personas no autorizadas. De igual manera, el ensayo se identificará claramente con letreros que indiquen que no se permite la entrada a personal NO autorizado.

Una vez que todas las evaluaciones en el ensayo sean concluidas, se procederá a realizar la destrucción del mismo mediante la incineración de todo el material vegetal resultante.

Así mismo, se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias posterior a la destrucción del ensayo que comprenderá el sitio de liberación y los bordes, para eliminar las plantas voluntarias que pudieran existir.

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 al área de liberación a dicha zona o zonas.

Los sitios de liberación se establecerán en zonas dónde no exista presencia de parientes silvestres de algodón, lo que constituye una barrera geográfica que impedirá cualquier interacción entre el algodón genéticamente modificado y sus parientes silvestres.

Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas a la polinización cruzada. Sin embargo, el polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada. El polen se puede transferir por insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas. Sin embargo, las especies silvestres del género *Gossypium* son diploides, mientras que las variedades cultivadas de *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* son tetraploides. Esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide (Niles & FASTER, 1984).

De igual manera, la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen. McGregor (1976) rastreó el movimiento de polen por medio de marcaje con partículas fluorescentes y encontró que, incluso entre flores localizadas a 45 - 60 m de un campo de algodón rodeado de numerosas colonias de abejas para asegurar una buena oportunidad de transferencia de polen, las partículas se detectaron sólo en 1.6% de las flores.

El acceso al ensayo estará restringido y sólo se permitirá la entrada al investigador responsable y su equipo, personal de la DBOGM del SENASICA que realicen vistas de inspección y personal de Bayer que esté debidamente acreditado por el área de Asuntos Regulatorios. En el caso de que



personas no autorizadas ingresen a la zona de liberación, el investigador responsable notificará el hecho a Bayer de México S.A. de C.V., quien a su vez dará aviso al SENASICA.

Para evitar que la semilla de algodón sea trasladada accidentalmente fuera de los sitios autorizados, se realizará la inspección y limpieza de la maquinaria antes y después de la siembra del ensayo. Así mismo, se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias, cuyo objetivo será eliminar las plantas procedentes de la semilla resultante del ensayo antes de que lleguen a la etapa de floración y de esta manera reducir al mínimo la interacción del algodón genéticamente modificado con el ambiente.

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

El algodón GlyTol™ TwinLink™ Plus será sembrado exclusivamente en los sitios de liberación autorizados en el permiso de liberación al ambiente, los cuales se localizarán a una distancia mínima de 100 m de poblaciones silvestres de algodón, 1000 metros de cualquier Área Natural Protegida y fuera de sitios Ramsar.

Todos los sitios de liberación serán georreferenciados para tener un control de los mismos y asegurar de esta manera que se localizan en sitios permitidos.

De igual manera, se establecerá un convenio de colaboración entre Bayer y el investigador cooperante para asegurar que la semilla de algodón proporcionada sea utilizada únicamente para la siembra del ensayo y se contará con un inventario detallado de la cantidad de semilla enviada, recibida, sembrada y remanente.

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

El sitio experimental de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus estará aislado de manera espacial, ya que no existen poblaciones silvestres de algodón cercanas a los sitios de liberación. Así mismo, considerando la baja capacidad de dispersión del polen de algodón, se establecerá una franja de protección de 20 metros alrededor del ensayo con algodón convencional.

Una vez finalizadas las evaluaciones, el ensayo y el bordo de protección serán destruidos y se establecerá un monitoreo de plantas voluntarias para impedir su permanencia en el ambiente.

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

5.1. Medidas de control para prevenir un evento de liberación no intencional.

Como se mencionó en la sección IV.b.1, la semilla de algodón **GLTC** que se utilizará para el establecimiento de los ensayos de campo en Etapa Experimental será transportada, almacenada y manejada de acuerdo con procedimientos que permiten prevenir la liberación no intencional fuera de las áreas de siembra autorizada:

- WI-RCM-001 - Realización de ensayos de campo.
- SOP-SGC-011 - Selección y evaluación de proveedores.
- GPS 12.07 - Evaluation of third parties.



- SOP-IMM-001 - Importación de semilla.
- RG-CMM-003 - Plan de importación.
- RG-CMM-022 – Variedades por número de lotes.
- WI-RCM-002 - Etiquetado y almacenamiento de muestras de semillas.
- GPS 12.01 – Preservation of Product Integrity.
- RG-ARC-12 - Transporte de semilla regulada.
- Checklist de limpieza de maquinaria.
- Checklist de auditoria de ensayos de campo.
- Checklist de monitoreo de plantas voluntarias.
- Hoja de transporte de semilla.

Todos estos formatos son considerados como **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

En adición a las características de tolerancia a herbicidas (*2mepsps* y *bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (*cry1Ab*, *cry2Ae* y *vip3Aa19*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón **GLTC** (sección I). Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas (promotores, péptidos de tránsito, terminadores) en el algodón **GLTC**, heredadas de los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

Las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agro-ecosistema. La similitud de las características de las plantas **GLTC** con el algodón convencional nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga en los mencionados eventos como consecuencia de la modificación genética (sección I).

Las características reproductivas no han sido alteradas en el algodón **GLTC**, ni en los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, a partir de los cuales se ha obtenido mediante cruzamiento convencional, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de cruzamiento convencional, cuando se compara con el algodón convencional (sección I).

5.2. Autorizaciones regulatorias de los eventos GHB614, T304-40, GHB619 y COT102.

El Servicio de Inspección de Sanidad Vegetal y Animal (APHIS, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos ha realizado el análisis de riesgo de los eventos GHB614 (GlyTol®), T304-40 x GHB619 (TwinLink™) y COT102, componentes del algodón GlyTol® TwinLink™ Plus (GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102) y determinó que es improbable que el algodón que contiene estos eventos represente un riesgo como plaga vegetal o maleza, debido a la ausencia de riesgo de plaga del material genético insertado, la ausencia de características de maleza, ausencia de respuestas atípicas a las enfermedades o plagas en el campo, ausencia de efectos deletéreos sobre los organismo no blanco o benéficos del agro-ecosistema y la falta de transferencia horizontal de genes. Por lo tanto, APHIS otorgó el estatus de no regulado a los eventos: GHB614 (2009), T304-40 x GHB619 (2011) y COT102 (2005).



En México, el algodón GlyTol® TwinLink™ Plus (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102), cuenta con la autorización No. 143300913X0017 de fecha 23 de julio de 2015 (COF - 048479), expedida por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la cual determinó que el algodón GLTC es equivalente sustancialmente a su contraparte convencional y puede ser usado como pienso para alimentación en animales y subproductos para alimentación humana.

5.3. Seguridad de la proteína 2mEPSPS.

La tolerancia al glifosato se obtiene disminuyendo la habilidad del herbicida para inhibir la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias. En el algodón **GLTC** la tolerancia al glifosato se basa en la expresión de la enzima 2mEPSPS codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz, en el cual se han incluido dos cambios para adaptarlo al uso preferido de codones del algodón. La proteína 2mEPSPS con baja afinidad por el glifosato, es altamente resistente a la inhibición por este herbicida y permite suficiente actividad enzimática para que las plantas puedan desarrollarse en presencia de herbicidas que contengan glifosato. La seguridad de la proteína 2mEPSPS ha sido evaluada exhaustivamente en diversos estudios científicos y los resultados han confirmado su inocuidad. La enzima 2mEPSPS no posee ninguna propiedad asociada con toxinas o alérgenos conocidos, incluyendo la falta de similitud de secuencia de aminoácidos con toxinas y alérgenos conocidos, una rápida degradación en fluidos gástricos e intestinales simulados y la ausencia de efectos adversos en ratón después administración intravenosa u oral a dosis de 10 o 2000 mg/kg de peso corporal. En conclusión, no se espera ningún riesgo derivado de la inclusión de la proteína 2mEPSPS en la cadena alimenticia humana o animal (Herouet *et al.*, 2009).

La proteína 2mEPSPS no es tóxica para los mamíferos ni posee características relacionadas con los alérgenos alimentarios. Entre los resultados que avalan esta conclusión se incluyen:

- a) La secuencia codificante del gen *2mepsps* proviene del maíz, un cultivo alimenticio que tiene un largo historial de uso seguro.
- b) Las proteínas EPSPS se presentan extensamente en la naturaleza, lo que incluye su presencia en piensos y alimentos y sus funciones son bien conocidas. No se ha relacionado con estos compuestos ningún efecto perjudicial para la salud. Debido a que la proteína 2mEPSPS deriva del maíz y contiene sólo dos modificaciones a nivel de aminoácidos, es de esperar que el perfil de seguridad de la nueva proteína relacionada con el tipo silvestre no cambie.
- c) La proteína 2mEPSPS no presenta ninguna homología con alérgenos, toxinas y antinutrientes conocidos. Tan solo presenta una elevada similitud estructural con proteínas no-alérgenas y no-tóxicas de la misma familia funcional. Su similitud con la enzima EPSPS del tipo silvestre es más alta, del orden del 99%.
- d) La proteína 2mEPSPS es una enzima altamente específica y tiene un peso molecular y propiedades funcionales muy similares a las de proteínas no-tóxicas y no-alérgenas, y pertenece a la clase de proteínas inocuas de la clase de las proteínas de la shikimato sintasa.
- e) Se ha documentado que la proteína 2mEPSPS se degrada rápida y completamente en fluidos similares a los gástricos e intestinales, en un tiempo de 15 segundos y menos de 1 minuto, respectivamente. Esto minimiza la probabilidad de que esta proteína pueda sobrevivir en el tracto digestivo humano y sea absorbida.
- f) La proteína 2mEPSPS está presente en el evento GA21. Este evento del maíz está aprobado para su distribución comercial para uso alimentario humano y animal en varios países, desde



hace varios años. Nunca se han reportado efectos dañinos para la salud humana, animal o el medio ambiente.

5.4. Seguridad de las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

Los insecticidas microbiales a base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tienen una historia de uso seguro en la agricultura de alrededor de 50 años. Las proteínas Cry están entre los ingredientes activos de estos insecticidas y actualmente los genes que codifican estas proteínas han sido introducidos en diversos cultivos mediante técnicas de ingeniería genética. Lo anterior implica que las proteínas Cry han sido usadas y consumidas de forma segura por humanos y animales durante décadas (Betz *et al.*, 2000; Onose *et al.*, 2008; McClintock *et al.*, 1995). Los niveles de proteínas Cry expresadas en los cultivos GM son muy bajos y se reducen todavía más debido al procesamiento de los alimentos. Adicionalmente, la extensa evaluación de proteínas Cry en cultivos GM no han mostrado ningún daño o efecto negativo en especies no blanco, incluyendo los humanos (Koch *et al.*, 2015).

La proteína Cry1Ab producida por el algodón GLTC con resistencia a insectos se derivan de la bacteria común del suelo *Bacillus thuringiensis* y es específicamente tóxica para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojó valores de NOEL³⁰ en concentraciones que representan diez veces o más las concentraciones ambientales esperadas de Cry1Ab (Cuadro 56) (ILSI, 2011).

Cuadro 56. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco.

Especie	Método de exposición	Duración de la exposición	Resultados
<i>Apis mellifera</i> larvas de abejas	Exposición a una sola dosis de proteína a 20 ppm	unidosis	NOEL >20 ppm
<i>Apis mellifera</i> abeja adulta	Exposición a una sola dosis a 20 ppm	unidosis	No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones de prueba y de control. En el grupo de prueba, la mortalidad media fue de 16.2%
<i>Chrysoperla carnea</i> (larvas de crisopa)	Exposición a 16.7 ppm	7 días	NOEL > 16.7 ppm
<i>Hippodamia convergens</i> (catarinas)	Exposición a una sola dosis a 20 ppm	unidosis	NOEL > 20 ppm
<i>Brachymeria intermedia</i> (himenóptero parasitoide)	Exposición a una sola dosis a 20 ppm	unidosis	NOEL > 20 ppm
<i>Folsomia candida</i> (Colémbolos)	Tejidos liofilizados de hojas (estimado de 50.6 µg Cry1Ab/g)	28 días	NOEL > 50% de la dieta
<i>Daphnia magna</i>	Exposición a la proteína Cry1Ab en el polen del maíz en múltiples concentraciones	48 horas	NOEC > 150 mg/L

³⁰ NOEL, NOAEL – (Nivel de Efecto No Observado, Nivel de Efecto Adverso No Observado) – La máxima dosis en un estudio toxicológico en el cual no fueron observados efectos tóxicos.



Lombriz de tierra	Exposición a la proteína Cry1Ab bacteriana en un sustrato de suelo artificial	14 días	NOEL > 200 ppm
<i>Mus musculus</i> (ratón)	Sonda aguda por vía oral a 3280 mg/kg	unidosis	Efecto no observado

Fuente: ILSI. 2011. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ab. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

En general muy pocas proteínas son tóxicas al ser ingeridas (Delaney *et al.*, 2008), sin embargo, para determinar la toxicidad de las proteínas en forma directa, la mejor estrategia es a través de estudios de toxicidad aguda evaluando concentraciones altas de la proteína durante un periodo corto de tiempo (Sjoblad *et al.*, 1992). Aunado a esto se cuenta con el hecho de que la exposición oral es considerada como la vía de exposición más relevante para la exposición a través de alimentos GM (Delaney *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, se realizó un estudio de toxicidad oral aguda utilizando proteína Cry1Ab producida en *E. coli* (lote MIN1443, pureza >98%), la cual es idéntica a la producida por el algodón GLTC. En el estudio se utilizaron ratones hembra OF1 a los cuales se les administró una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal y todos los animales fueron observados durante un periodo de 15 días, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones OF1 y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry1Ab es mayor a 2000 mg/kg de peso corporal (Rouquie, 2007³¹). De la misma manera, se realizó un estudio de toxicidad aguda con la proteína Cry2Ae producida en *B. thuringiensis* (lote 1410_Cry2Ae, pureza 90%) a una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, administrada vía oral a un grupo de 6 ratones macho y 6 ratones hembra C57BL/6J, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones C57BL/6J y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry2Ae es mayor a 2000 mg/kg de peso corporal (Totis, 2015³²).

5.5. Seguridad de la proteína PAT/bar.

Por su uso tan extendido en cultivos biotecnológicos, la seguridad de la proteína PAT ha sido ampliamente evaluada. Cuando la secuencia de aminoácidos de la enzima PAT se sometió a análisis comparativo de polipéptidos usando el algoritmo FASTDB de Intelligenetics, no mostró una homología significativa con otras proteínas presentes en las bases de datos, excepto con otras fosfinotricina acetiltransferasas que se originan a partir de diferentes organismos. No se observó semejanza con toxinas potenciales o con alérgenos. No se esperan efectos tóxicos o alérgicos provenientes de PAT, ya que las acetiltransferasas no poseen estabilidad proteolítica o térmica y tiene una alta especificidad de sustrato (Herouet *et al.*, 2005).

5.6. Seguridad de las proteínas Vip3Aa19 y APH4.

Las proteínas Vip3Aa producidas por el algodón GLTC con resistencia a insectos se derivan de las bacterias comunes del suelo *Bacillus thuringiensis* y son específicamente tóxicas para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojó valores de NOEL en concentraciones significativamente mayores que las

³¹ Rouquie, D. 2007. Cry1Ab protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-295507-01-1.

³² Totis, M. 2015. Cry2Ae protein. Acute toxicity study by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-508050-01-1.



concentraciones ambientales esperadas de Vip3Aa (Cuadro 57). Los estudios de campo sugieren que el cultivo de plantas de maíz GM que expresan Vip3Aa no afecta la abundancia de artrópodos no blanco, con la posible excepción de los depredadores específicos de las plagas blanco controladas por Vip3Aa. La Vip3Aa en plantas puede ser tóxica para los lepidópteros no blanco, pero las evaluaciones regulatorias de riesgo para los productos aprobados han concluido que es posible reducir el riesgo cuando se lo compara con otras prácticas de control de insectos. El peso de las pruebas de los análisis de fenotipo y de composición demuestra que la expresión de Vip3Aa en los eventos aprobados de maíz y algodón no alteró la fisiología general de las plantas del cultivo e indica que dichas plantas no tienen más probabilidades de convertirse en malezas ni en invasivas que sus equivalentes convencionales (ILSI, 2012).

Cuadro 57. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco.

Especie	Método de exposición	Duración de la exposición	Resultados
<i>Aleochara bilineata</i> (estafilínido)	Exposición a dieta de 500 µg/g	35 días	NOEC > 500 µg/g
<i>Apis mellifera</i> (larvas de abeja)	Exposición a proteína en dieta de 500 µg/g	24 días	NOEC > 500 µg/g
<i>Chrysoperla carnea</i> (larvas de crisopa)	Exposición a 21.7 ppm	13 días	NOEC > 21.7 ppm
	Exposición a dieta de 7.25 mg/g	30 días	NOEC > 7.25 mg/g
<i>Coccinella septempunctata</i> (catarinas)	Exposición a dieta de 7.25 mg/g	15 días	NOEC > 7.25 mg/g
<i>Coleomegilla maculata</i> (catarinas)	Exposición a dieta de 7.24 µg/g	20 días	NOEL > 7.24 µg/g
<i>Colinus virginianus</i> (codorniz)	Exposición a 400 mg/kg de peso corporal	unidosis	NOEL > 400 mg/kg
<i>Daphnia magna</i>	Exposición a 10 µg/L de agua	48 horas	NOEC > 10 µg/l
<i>Eisenia foetida</i> (lombriz)	Exposición a la proteína Vip3Aa en 3.6 µg/g en suelo artificial	14 días	NOEL > 3.6 µg/g
<i>Folsomia candida</i> (colémbolos)	Exposición a dieta de 43.2 µg/g	28 días	NOEC > 43.2 µg/g
<i>Gallus domesticus</i> (pollo)	Exposición a dieta de 0.588 µg/g	49 días	NOEC > 0.588 µg/g
<i>Ictalurus punctatus</i> (bagre)	Exposición a dieta de 7.1 µg/g	30 días	NOEC > 7.1 µg/g
<i>Mus musculus</i> (ratón)	Sonda aguda por vía oral a 1250 - 3675 mg/kg	unidosis	NOEL > 3675 mg/kg
<i>Orius insidiosus</i> (chinche pirata)	Exposición a dieta de 7.25 mg/g	21 días	NOEC > 7.25 mg/g

Fuente: ILSI. 2012. Revisión de la seguridad ambiental de Vip3Aa. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

La proteína APH4 no es tóxica para mamíferos ni posee características relacionadas con los alérgenos alimentarios:

- a) La proteína APH4 no se detecta en la mayor parte de las muestras de semillas de algodón COT102, y cuando es detectada, los niveles de proteína están por debajo del límite de cuantificación. Se espera que eventuales trazas de la proteína APH4 presentes en las semillas de algodón, se eliminarán por los métodos estándar de procesado de la semilla.
- b) No presenta homología con toxinas o alérgenos conocidas. Se realizó una búsqueda bio-



informática para comprobar si la secuencia de aminoácidos de la proteína APH4 muestra homología con proteínas que sean conocidas como toxinas. La proteína APH4 no mostró homología significativa con proteínas que son identificadas como toxinas en la base de datos GenBank.

- c) La proteína APH4 es rápidamente degradada proteolíticamente, cuando se simulan las condiciones del fluido gástrico de mamíferos, conteniendo pepsina y pancreatina.

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

La destrucción del ensayo será realizada una vez que todas las evaluaciones sean concluidas. Las plantas de algodón completas, incluida la semilla y la fibra, serán cortadas a nivel del suelo y acomodadas en montones, los cuales serán destruidos mediante incineración.

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 país de origen del algodón GlyTol® TwinLink™ Plus (GLTC) es los Estados Unidos de América y cuenta con autorización para su comercialización bajo es estatus de no-regulado desde el 22 de mayo de 2009 para el evento GlyTol® (BCS-GHØØ2-5), del 12 de octubre de 2011 para los eventos combinados TwinLink™ (BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8) y del 6 de julio de 2005 para el evento COT102 (SYN-IR1Ø2-7). Es importante señalar que en este país la autorización de eventos individuales es suficiente y no es necesaria la aprobación para la utilización de estos en eventos apilados o *stacks*.

En Estados Unidos las principales áreas de liberación de algodón biotecnológico están ubicadas en la denominada franja algodонера, la cual comprende cuatro grandes regiones: sureste, oeste medio, suroeste y oeste ([Figura 117](#)). 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), 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 son diversas, con un periodo de siembra que comprende desde marzo a junio y un periodo de cosecha entre agosto y diciembre (ERS-USDA, 2010).

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 algodонера 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 ([Cuadro 58](#)).

[Cuadro 58](#). 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>).

Los principales tipos climáticos que atraviesan la franja algodonera son clima húmedo subtropical (Cfa), clima semiárido (BSk) y clima desértico (BWh) (Figura 118).

Figura 117. Regiones productoras de algodón de los Estados Unidos (Cotton belt).

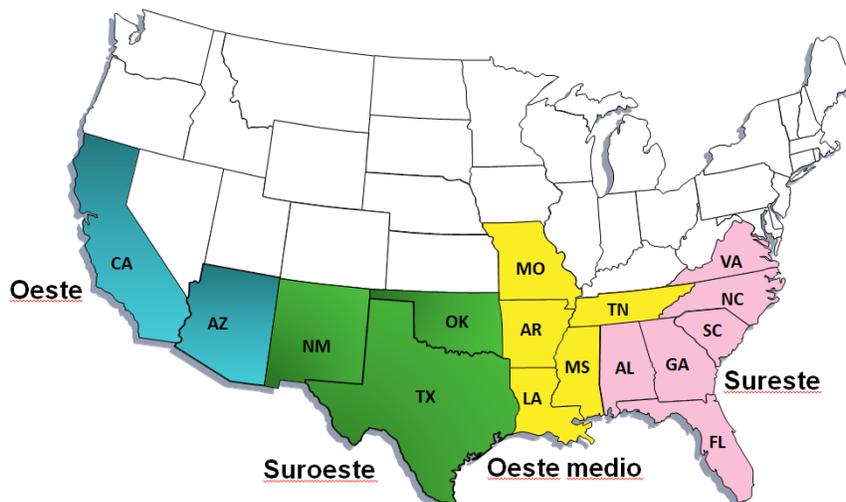
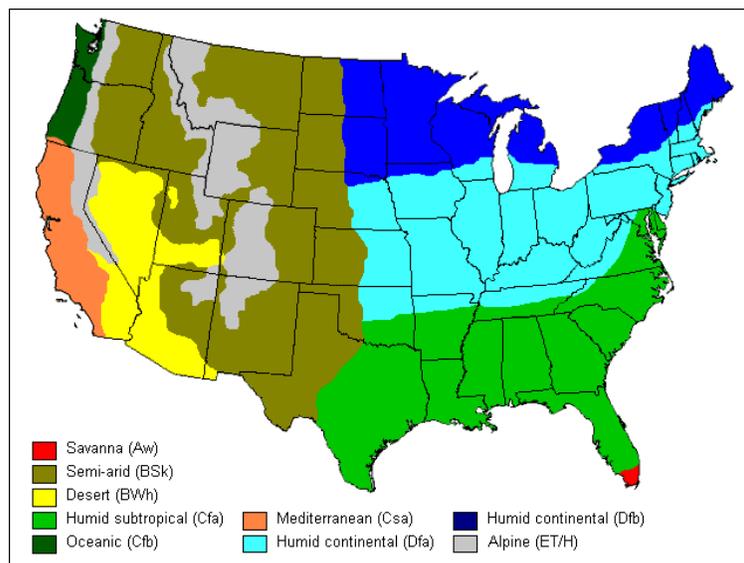


Figura 118. Principales tipos climáticos de Estados Unidos.



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

1. Tecnología GlyToI® (GHB614).

El potencial de cruzamiento se puede definir como la capacidad de escape de genes a parientes silvestres de algodón. En la evaluación de impacto ambiental de algodón biotecnológico realizado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, se indica que la posibilidad de que la introgresión de genes a partir de líneas de algodón Roundup Ready® transgénico, en plantas sexualmente compatibles silvestres o cultivadas es muy bajo (USDA 1995). En los Estados Unidos se encuentran dos especies de *Gossypium* silvestre: *G. thurberi* Todaro, el cual se ha ubicado e en la región de montaña en Arizona a altitudes de 760 a 1500 m y *G. tomentosum* que se encuentra en Hawái. De estas especies sólo *G. tomentosum* es capaz de cruzarse con el algodón cultivado (*G. hirsutum*) y que podría producir descendencia fértil. No existe ninguna ventaja conferida por el evento GHB614 que permita que esta cruce 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 (1976) logro encontrar que en 45 a 60 m de distancia de la planta de origen, sólo el 1.6% mostró la presencia de las partículas fluorescentes. Otros grupos de investigación han establecido distancias más cortas para que pueda ocurrir polinización cruzada (Kareiva *et al.*, 1994; Sundstrom, 2001; Van Deynze *et al.*, 2005).

El algodón (*G. hirsutum*) no es considerado una maleza y no tiene parientes silvestres sexualmente compatibles excepto quizás *G. tomentosum* en Hawaii, 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 en 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 gossipol de las plantas o niveles de anti nutrientes entre algodón GHB614 y su 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. 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 cultivo (Fawcett & Towery, 2004). 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 GHB614. 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 haya ocurrido una degradación significativa de las proteínas en el momento en que 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 (2006a)³³, 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 (2000 mg de proteína/kg de peso corporal).

En cuanto a la toxicidad del algodón GHB614 para las aves y mamíferos no se detectaron cambios significativos en el contenido de gossipol y antinutrientes en los niveles generales de la planta, por tal razón no se prevé que el algodón GHB614 tenga 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 GHB614.

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 algodonnero en realidad puede aumentar el suministro de hábitat y alimento para los insectos benéficos.

2. Tecnología TwinLink™ (T304-40 x GHB119).

³³ Rouquie, D. 2006. 2mEPSPS protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex, France. M-276952-01-1



Los insectos son los organismos con mayor posibilidad de tener una exposición significativa al algodón T304-40 x GHB119, 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* (catarinas), o en la abeja de la miel, que podría estar expuesta al polen de plantas de algodón T304-40 x GHB119.

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 una vida media 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 T304-40 x GHB119 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 T304-40 x GHB119, 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 cultivo (Fawcett & Towery, 2004). 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 expresadas por el algodón T304-40 x GHB119 no representan un riesgo significativo para la flora y fauna.

3. Tecnología COT102.

Después de realizar una serie de estudios durante varios ciclos agrícolas se ha logrado concluir que no hay efectos indeseados con respecto a las características de las plantas para convertirse en plagas. No existe un impacto ambiental significativo reportado para la familia de las proteínas *Bt*



demostrados en los productos microbianos y proteínas incorporadas a las plantas de algodón. Además, en todos los casos que la proteína Vip3Aa19 fue probada para evaluar su impacto en los organismos no blanco no se determinaron efectos adversos y la concentración sin efecto observable (NOEC), fue comparativamente más alta que la concentración ambiental máxima, lo cual corrobora que representa un riesgo mínimo para los organismos no blanco.

Durante la evaluación de organismos no blanco, se realizó la evaluación del polen de algodón COT102 mediante la exposición de 21 días *in vitro* de larvas de abejas (*Apis mellifera* L.) de segundo instar (24 a 48 horas de edad), las larvas fueron transferidas a placas en los días 4 a 8 y mantenidas a una temperatura que varió entre 31 a 35 °C realizando la prueba casi en total oscuridad. Se alimentaron con dos dietas diferentes, la primera contenía 46 mg de polen de algodón convencional/g de dieta y la segunda con 46 mg de polen de algodón COT102/g de dieta, así como un control de dieta sin polen. Al final se concluye que no se detectó ninguna diferencia estadística entre las dos fuentes de polen ensayados en relación con el control.

Dentro del análisis de otros insectos no blanco se ha probado en organismos como *Coleomegilla maculata*, mediante el análisis de toxicidad crónica al incluir en su dieta cantidades de polen con la proteína Vip3Aa19, utilizando adultos con 8 a 9 días de edad, éstos fueron alimentados con dieta que contenía el 5% w/w (equivalente a 40 µg de proteína Vip3Aa19/g de dieta) y un control negativo. Después de 21 días de exposición sobrevivieron el 93% de los individuos sometidos a la dieta con proteína Vip3Aa19 comparado contra un 97% de individuos con el control negativo, lo cual nos permite concluir que el NOEC es 56% de concentración de polen con la proteína Vip3Aa19 (concentración más alta muestreada) lo cual es equivalente a 7.24 ppm de proteína Vip3Aa19.

Además de las especies presentadas anteriormente, debido a la falta de evidencia que demuestre la toxicidad Vip3Aa19, no se espera que grupos tales como escarabajos (Coleóptera), libélulas (Odonata), moscas (Díptera), naucoris (Hemíptera) y chapulines (Ortóptera), sean sensibles a la proteína.

En su evaluación de la seguridad ambiental de las proteínas Bt incorporadas a las plantas, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) llevó a cabo una extensa revisión de la información relevante que describe el potencial teórico para la transferencia horizontal de genes, es decir, la posibilidad de que los genes de los cultivos *Bt*, incluidos los genes marcadores, puedan ser transferidos a los organismos del suelo. Se concluye que la posibilidad de que esto ocurra es poco probable y que las consecuencias potenciales de la transferencia horizontal de genes, si ocurriera, no presentaría ningún riesgo significativo. Esta evaluación también es relevante para las plantas de algodón evento COT102 y sus derivados o eventos apilados, que expresan el gen *vip3Aa19* de *Bacillus thuringiensis* y el gen marcador *aph4* aislado de *E. coli*. Ambos genes (o genes con homología y equivalencia funcional) se sabe que están presentes de forma natural en las poblaciones microbianas del suelo.

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 otorgar la des-regulación de los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) evaluó los efectos de las proteínas expresadas por dichos eventos (2mEPSPS, Cry1Ab, Cry2Ae, PAT/*bar*, Vip3Aa19 y APH4), sobre factores bióticos (organismos no blanco, fauna, como alimento para ganado, etc.) y abióticos (suelo



y mantos acuíferos). Como resultado de las evaluaciones, la autoridad antes citada autorizó la desregulación para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

Dentro de los estudios de riesgo que se pueden analizar encontramos algunos investigadores que evaluaron la posibilidad de flujo de polen entre las especies de algodón. Van Deynze *et al.* (2005) 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 transgénicas 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 1625 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 1625 m.

Otros estudios evalúan el efecto de las proteínas insecticidas sobre polinizadores, tal es el caso del reportado por Duan *et al.* (2008), quien realizó 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 realizó 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). Los resultados muestran que las proteínas Cry de *Bt* utilizadas en los cultivos modificados genéticamente comercializados para el control de plagas de lepidópteros y coleópteros, no afectan negativamente a la supervivencia de las larvas o de adultos en el laboratorio. Aunque las presiones adicionales que las abejas enfrentan en el campo podrían, 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.

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 una 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 insecticidas 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) examinaron 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 al herbicida glufosinato de amonio, en base a una revisión de la literatura publicada y estudios experimentales sobre la valuación de la seguridad, apoyan 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 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.*, 2005).

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 (EPSPS), que es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en todas las plantas, hongos y bacterias. En el caso del algodón GHB614, 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 se desarrollen 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 efectos 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).

Rouquie (2006b)³⁴ 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 homología de la secuencia de 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 no 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, el algodón T304-40 x GHB119, el algodón GHB614 y el algodón COT102, no 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 GlyTol TwinLink™ Plus (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7), es igual que sus progenitores y por consiguiente seguro.

³⁴ Rouquie, D. 2006b. 2mEPSPS PROTEIN. Overall amino acid sequence homology search with known toxins and allergens. *In silico* Study report SA 06103. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-273792-01-1.



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.

Entre las principales plagas lepidópteras del algodón se encuentran el complejo bellotero (*Heliothis virescens* Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie), el gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith). El control de estas plagas se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro (

Cuadro 59), 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).

Cuadro 59. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodón (PLM, 2006).

Ingrediente Activo	Categoría Toxicológica	Grupo Químico
Acefate	Ligeramente tóxico	Organofosforado
Azinfos metílico	Altamente tóxico	Organofosforado
Betaciflutyn	Ligeramente tóxico	Piretroide
Bifentrina	Ligeramente tóxico	Piretroide
Carbaril	Moderadamente tóxico	Carbamato
Cipermetrina	Moderadamente tóxico	Piretroide
Clorfenapir	Ligeramente tóxico	Pirrol
Clorpirifos etil	Moderadamente tóxico	Organofosforado
Cyflutrin	Ligeramente tóxico	Piretroide
Deltametrina	Ligeramente tóxico	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



Thiodicarb	Moderadamente tóxico	Carbamato
Triazofos	Altamente tóxico	Organofosforado

El algodón GLTC expresa las proteínas insecticidas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19, las cuales actúan de manera específica sobre algunas especies de insectos lepidópteros que son plagas de importancia económica en el cultivo del algodón, 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 tres 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, reforzando principalmente la acción efectiva en contra de gusano bellotero (*Heliothis virescens* Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) que actualmente representan un serio problema en los cultivos de algodón. 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 combinación de las proteínas insecticidas Cry1Ab (T304-40), Cry2Ae (GHB119) y Vip3Aa19 (COT102), proveen un control más eficiente de insectos lepidópteros plaga del algodón y representa una nueva herramienta para prevenir el desarrollo de resistencia en los insectos. La combinación de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (T304-40/ GHB619) confiere tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, permitiendo el uso de dos mecanismos de acción herbicida para un manejo más eficiente de la maleza en el cultivo del algodón, esta combinación de mecanismos de acción es particularmente importante para el manejo y prevención de resistencia de las especies de maleza a los herbicidas.

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 país de origen del algodón GLTC (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102) es los Estados Unidos de América y de acuerdo con la legislación del país de origen y a la autoridad encargada de su aprobación Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), el algodón GLTC, por ser un producto de cruzamiento convencional de dos eventos independientes, no necesita una aprobación como evento apilado en el país de origen.

*El evento **COT102 (SYN-IR1Ø2-7)** es propiedad de la empresa Syngenta Agro, S.A. de C.V., para información más detallada consultar la información de caracterización molecular, nutrimental y toxicológica del evento **COT102** sometida por Syngenta en el paquete regulatorio para resolver la solicitud de autorización del algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102**.*

Cuadro 60. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón COT102 (OECD: SYN-IR1Ø2-7).



País	Consumo humano	Consumo animal	Cultivo
Australia	2005		
Canadá	2011	2011	
Japón	2012	2012	
México	2010	2010	
New Zealand	2005		
South Korea	2014		
Estados Unidos de América	2005	2005	2011

Fuente: www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/; www.accessdata.fda.gov/; www.aphis.usda.gov/biotechnology/

C



uadro 61. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón GHB614 (OECD: BCS-GHØØ2-5).

País	Consumo humano	Consumo animal	Cultivo
Australia	2009		
Brasil	2010	2010	2010
Canadá	2008	2008	
China	2010	2010	
Colombia		2012	
Costa Rica			2009
Unión Europea	2011	2011	
Japón	2010	2010	
México	2008		
New Zealand	2009		
South Korea		2010	
Estados Unidos de América	2009	2009	2009

Fuente: www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/; www.accessdata.fda.gov/; www.aphis.usda.gov/biotechnology/

Cuadro 62. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón T304-40 x GHB119 (OECD: BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8).

País	Consumo humano	Consumo animal	Cultivo
Brasil	2011	2011	2011
Canadá		2011	
México	2012		
Estados Unidos de América	2011		

Fuente: www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/; www.accessdata.fda.gov/; www.aphis.usda.gov/biotechnology/

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.

1. Malezas en el cultivo del algodón.

La presencia de malezas es uno de los principales problemas que limitan la producción del cultivo de algodón. Las malezas presentan una alta adaptación a las áreas disturbadas por las labores agrícolas y si no son controladas oportuna y eficientemente, disminuyen significativamente el rendimiento y la calidad de fibra del algodón (Rosales y Sánchez, 2010).

La competencia de la maleza afecta el desarrollo y rendimiento del algodón y su severidad depende de las malezas presentes, densidad del cultivo y la maleza, época de emergencia de la maleza, sistema de siembra, condición de humedad, nivel de fertilidad del suelo y duración del período de competencia, entre otros. En general, la competencia es más crítica durante la primera etapa del desarrollo vegetativo del cultivo. Lo anterior ha dado como resultado la definición de este



lapso como el período crítico de competencia (PCC): el tiempo máximo que el cultivo tolera la competencia de maleza sin reducciones significativas de su rendimiento y el tiempo mínimo de ausencia de maleza que requiere el cultivo para expresar su máximo rendimiento. En este aspecto, se considera que las reducciones significativas o umbral económico ocurren cuando las pérdidas de rendimiento igualan al costo de control de maleza. Con fines prácticos se ha considerado un 5% de reducción de rendimiento como el umbral económico en la mayoría de los cultivos anuales (Rosales y Sánchez, 2010).

Se ha determinado que el período crítico de competencia de maleza anual en algodón se presenta en los primeros 50 a 60 días después de la emergencia del cultivo, en los cuales si no se controlan eficientemente las malezas se reduce el rendimiento de 30 a 50%. Además, es necesario mantener un buen control de maleza hasta la cosecha del algodón con el fin de obtener una fibra libre de impurezas, ya que la recolección se realiza en forma mecánica (Rosales y Sánchez, 2010).

Al conjunto de daños causados por la maleza a los cultivos se le denomina interferencia. La interferencia incluye la reducción del rendimiento por competencia, la disminución en la calidad del producto cosechado, el aumento en los costos de cosecha y la mayor incidencia de plagas y enfermedades. Las pérdidas de rendimiento son ocasionadas principalmente por la competencia entre las malezas y cultivo por luz, agua y nutrimentos, factores básicos para el desarrollo de las plantas (Rosales y Sánchez, 2010).

Además de la competencia, existe otro tipo de daños causados por la presencia de maleza en algodón, comúnmente llamados daños indirectos. Estos daños incluyen: mayor incidencia de insectos y patógenos que utilizan a las malezas como hospederas alternantes; disminución en la calidad de la producción por el incremento de humedad e impurezas en la fibra; dificultad de cosecha mecánica y depreciación de los terrenos agrícolas por altas infestaciones de maleza (Rosales y Sánchez, 2010).

2. Algodón genéticamente modificado tolerante a herbicidas.

Antes de 1996, el algodón era el único cultivo extensivo que no contaba con un herbicida postemergente efectivo para el control de malezas dicotiledóneas, que no causara daños al cultivo, retrasos en su maduración o reducción de su rendimiento (Paulsgrove *et al.*, 2005). La falta de un herbicida postemergente para controlar malezas de hoja ancha se agravaba, por ser el algodón un cultivo poco competitivo en sus primeras etapas de desarrollo. Por medio de la biotecnología ha sido posible desarrollar variedades de algodón con resistencia a varios herbicidas, que ofrecen un buen control de maleza y selectividad al cultivo (Rosales y Sánchez, 2010).

2.1. Algodón tolerante a glifosato.

El glifosato es un herbicida con acción sistémica que controla zacates y hojas anchas anuales y perennes. Su modo de acción es la inhibición de la síntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano al inhibir la enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3- fosfato sintasa). El glifosato se comercializó a partir de 1974, principalmente para el control no selectivo de malezas en terrenos sin cultivo. Sin embargo, sus características de alta sistemicidad, poca toxicidad a animales y al hombre y ausencia de residuos en el suelo, lo convirtieron en el herbicida ideal para el desarrollo de cultivos genéticamente modificados con tolerancia a su acción.



En 1983, se aisló la bacteria de suelo *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 que es altamente tolerante al glifosato porque su enzima EPSPS es menos sensitiva que la enzima EPSPS encontrada en las plantas. Para 1986 se desarrollaron cultivos resistentes a glifosato (RG) y en 1997 se desarrollaron las primeras variedades de algodón RG. Sin embargo, la selectividad en estas variedades era marginal, pues sólo se podía aplicar el algodón hasta la etapa de cuarta hoja, ya que aplicaciones en etapas posteriores se asociaban con el aborto de frutos y la pérdida de rendimiento. Actualmente existen variedades de algodón que permiten la aplicación de glifosato hasta siete días antes de la cosecha (Rosales y Sánchez, 2010).

2.2. Algodón tolerante a glufosinato.

El glufosinato es un inhibidor de aminoácidos que mata a las plantas sensibles al inhibir a la enzima glutamina sintetasa, que cataliza la conversión del ácido glutámico y el amoníaco en glutamina. La inhibición de la glutamina sintetasa provoca una acumulación de amoníaco y glioxilato que causa daños a la estructura de los cloroplastos, disminución de la fotosíntesis y finalmente la muerte de los tejidos. El algodón resistente a glufosinato fue comercializado por primera vez en 2004 como algodón Liberty Link (LL) y fue creado a través de la inserción del gen *bar* aislado de la bacteria del suelo *Streptomyces hygroscopicus*. El algodón LL transformado con el gen *bar* expresa resistencia a glufosinato a través de la inactivación de la acción del herbicida. El algodón LL tiene una excelente tolerancia al glufosinato, que es un herbicida no selectivo con acción primordialmente de contacto y puede aplicarse desde la emergencia hasta los inicios de la floración. El glufosinato controla tanto malezas gramíneas como de hoja ancha, pero requiere aplicarse en malezas en sus primeros estados de desarrollo, pues su acción es de contacto y no deja residuos en el suelo que puedan afectar a cultivos sembrados en rotación (Rosales y Sánchez, 2010).

La tecnología GlyTol® TwinLink™ Plus (GLTC) combina la resistencia a las plantas de algodón al ataque de insectos lepidópteros, con la tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, en las variedades de algodón de Bayer CropScience.

Con relación al manejo de maleza en algodón, las variedades GlyTol® TwinLink™ Plus son tolerantes a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato mediante la expresión de las proteínas PAT de *Streptomyces hygroscopicus* y 2mEPSPS del maíz, permitiendo el uso de dos mecanismos de acción herbicida para un manejo más eficiente de la maleza en el cultivo del algodón, esta combinación de mecanismos de acción es particularmente importante para el manejo y prevención de resistencia de las especies de maleza a los herbicidas.

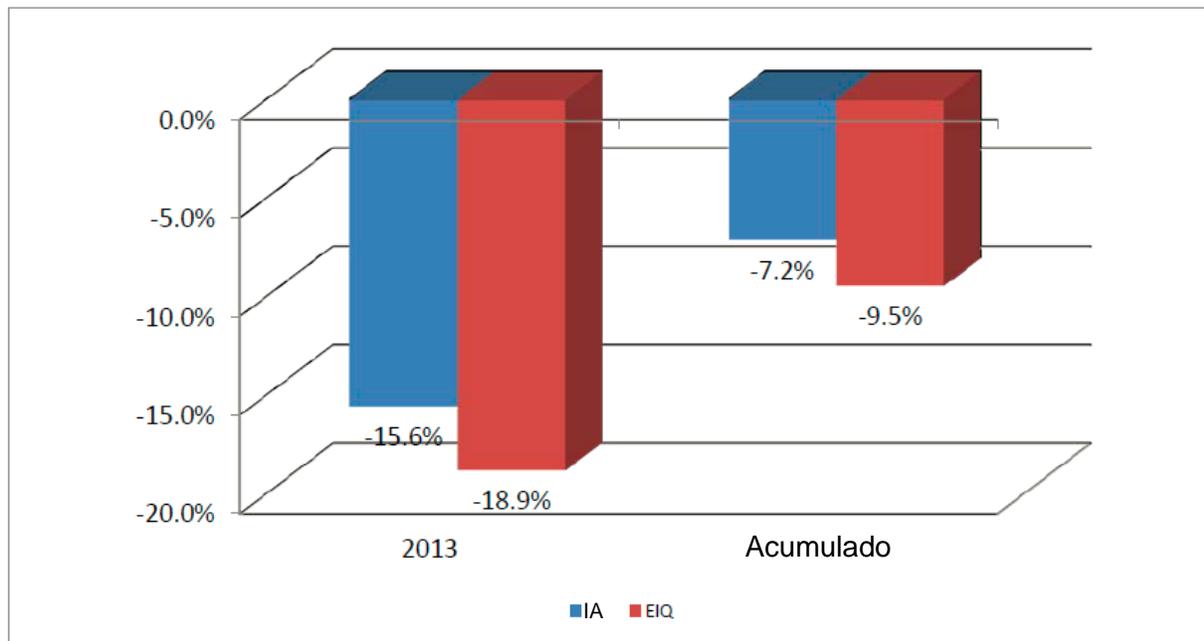
Adicionalmente, el uso de cultivos tolerantes a herbicidas ofrece una serie de ventajas de carácter agronómico y ambiental:

- Reducción significativa en el uso de herbicidas (kg de I.A.) y utilización de productos con menor impacto ambiental (EIQ). En 2013, el efecto global de la utilización de tecnologías de tolerancia a herbicidas en los países en los que se han adoptado, ha sido una reducción del 15.6% de I.A. y una disminución del impacto ambiental de 18.9%. En conjunto, desde 1997 el uso de herbicidas se ha reducido en 7.2% (- 21 millones de kg) y el impacto ambiental disminuyó 9.5% (



- [Figura 119](#)).
- Disminución de la contaminación del suelo y mantos freáticos al utilizar herbicidas con menor impacto ambiental ([Cuadro 63](#)).
- Mayor flexibilidad en el control de maleza comparado con el uso de herbicidas en el algodón convencional: en los cultivos tolerantes a herbicidas, estos son aplicados en post emergencia a la maleza y al cultivo. Las aplicaciones se realizan sólo cuando las poblaciones de maleza superan los umbrales económicos y durante el periodo crítico de competencia del cultivo con la maleza.
- Control de un amplio espectro de maleza: glufosinato de amonio y glifosato poseen modos de acción distintos y controlan una gran variedad de especies de maleza de diferentes familias botánicas ([Cuadro 64 - 65](#)).
- Eliminación de labores de control manual y aplicaciones tempranas dirigidas, de herbicidas que requieren equipo especial para su aplicación.
- Disminución de los costos para el control de maleza, en comparación con las alternativas tecnológicas.
- Compatibilidad con prácticas de manejo integrado de plagas (MIP) y técnicas de conservación de suelo, como agricultura de conservación. La “labranza cero”, también conocida como “siembra directa” implica reemplazar la labranza convencional por la aplicación de un herbicida no selectivo en presiembra. La semilla es luego sembrada directamente en el suelo atravesando el rastrojo del cultivo anterior. Entre los beneficios de la labranza cero se pueden mencionar la conservación de la humedad del suelo, la reducción en la erosión del suelo, una mejora en la estructura del suelo, incremento en el contenido de carbono y reducción en el uso de combustible.
- Reducción de la emisión de gases de efecto invernadero (disminución en el uso de combustibles necesarios para la fabricación, transporte y aplicación de insecticidas). Cuando se realiza labranza convencional, la cantidad de combustible aumenta, lo que directamente implica mayor emisión de gases a la atmósfera ([Cuadro 66](#)).

Figura 119. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a herbicidas en Estados Unidos, Australia, Argentina y Sudáfrica 1997-2013 (Brookes y Barfoot, 2015).



Cuadro 63. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.

Ingrediente activo (I.A.)	Grupo químico	EIQ
Oxifluorfen	Difenileter	33.82
Pendimetalin	Dinitroanilina	30.17
Fluazifop-p-butil	Arilofenoxi propionato	28.71
Diuron	Dimetilurea	26.47
Bensulide	Organofosforado	26
Quizalofop-etil	Arilofenoxi propionato	22.14
Piritiobac sodio	Pirimidincarboxy	21.7
Setoxidim	Ciclohexanediona	20.89
Glufosinato de amonio	Ácidos fosfínicos	20.2
Clomazone	Isoxazolidinona	19.63
Linuron	Fenilurea	19.32
Trifluralina	Dinitroanilinas	18.83
MSMA	Arsénico orgánico	18
Alaclor	Cloroacetamida	17.86
Clethodim	Ciclohexanediona	17
Prometrina	Triazina	15.37
Glifosato	Glicinas	15.33
Fluometuron	Fenilurea	14.27



Fuente: A method to measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: list of Pesticides, Part 3: Herbicides 2012. Integrated Pest Management. Disponible en: www.nysipm.cornell.edu

Cuadro 64. Espectro de control de maleza del herbicida glufosinato de amonio.

Nombre científico	Familia botánica	Clasificación morfológica
<i>Brachiaria plantaginea</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Digitaria ciliaris</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Paspalum virgatum</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Setaria parviflora</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Rottboellia cochinchinensis</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Panicum fasciculatus</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Echinochloa colona</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Urochloa fasciculata</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Leptochloa mucronata</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Chloris virgata</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Setaria grisebachii</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Eleusine indica</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Eragrostis mexicana</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Cyperus esculentus</i>	Cyperaceae	Hoja angosta
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Melampodium perfoliatum</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Aldama dentata</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Melampodium divaricatum</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Simsia eurylepis</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Tridax procumbens</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Anoda cristata</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Bidens odorata</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Tagetes lunulata</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Tithonia tubiformis</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Simsia amplexicaulis</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Ambrosia psilostachya</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Croton lobatus</i>	Euphorbiaceae	Hoja ancha
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Euphorbiaceae	Hoja ancha
<i>Acalypha ostryfolia</i>	Euphorbiaceae	Hoja ancha
<i>Amaranthus palmeri</i> , <i>A. hybridus</i>	Amaranthaceae	Hoja ancha
<i>Ipomoea purpurea</i>	Convolvulaceae	Hoja ancha
<i>Priva lappulacea</i>	Verbenaceae	Hoja ancha
<i>Cissus sicyoides</i>	Vitaceae	Hoja ancha
<i>Borreria brownii</i>	Rubiaceae	Hoja ancha
<i>Cardiospermum halicacabum</i>	Sapindaceae	Hoja ancha
<i>Solanum erianthum</i>	Solanaceae	Hoja ancha
<i>Rivina humilis</i>	Petiveriaceae	Hoja ancha



<i>Physalis ixocarpa</i>	Solanaceae	Hoja ancha
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacaceae	Hoja ancha

Fuente: Etiqueta Finale Ultra® (280 g de i.a) - Bayer CropScience.

Cuadro 65. Espectro de control de maleza del herbicida glifosato.

Nombre científico	Familia botánica	Clasificación morfológica
<i>Rottboellia chochinchinensis</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Eragrostis mexicana</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Chloris virgata</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Brachiaria plantaginea</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Sorghum halepense</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Cynodon dactylon</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Panicum maximum</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Leptochloa filiformis</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Bromus carinatus</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Eleusine indica</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Leptochloa filiformis</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Cenchrus echinatus</i>	Poaceae	Hoja angosta
<i>Cyperus esculentus</i>	Cyperaceae	Hoja angosta
<i>Tithonia tubiformis</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Flaveria trinervia</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Galinsoga parviflora</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Melampodium divaricatum</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Anoda cristata</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Aldama dentada</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Helianthus ciliaris</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae	Hoja ancha
<i>Amaranthus spinosus</i> , <i>A. hybridus</i> , <i>A. palmeri</i>	Amaranthaceae	Hoja ancha
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Brassicaceae	Hoja ancha
<i>Lepidium virginicum</i>	Brassicaceae	Hoja ancha
<i>Ipomoea purpurea</i>	Convolvulaceae	Hoja ancha
<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Hoja ancha
<i>Euphorbia hirta</i>	Euphorbiaceae	Hoja ancha
<i>Acalypha alopecuroide</i>	Euphorbiaceae	Hoja ancha
<i>Sida acuta</i>	Malvaceae	Hoja ancha
<i>Malva parviflora</i>	Malvaceae	Hoja ancha
<i>Melilotus indicus</i>	Fabaceae	Hoja ancha
<i>Oxalis latifolia</i>	Oxalidaceae	Hoja ancha
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacaceae	Hoja ancha
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	Hoja ancha



<i>Chenopodium album</i>	Chenopodiaceae	Hoja ancha
<i>Commelina serrulata</i>	Commelinaceae	Hoja ancha

Fuente: Etiqueta Faena® Fuerte (363 g de i.a) - Monsanto, Etiqueta Glyfos® (360 g de i.a.) – Cheminova Agro, Etiqueta Durango™ (480 g de i.a) – Dow AgroSciences.

Cuadro 66. Consumo de combustible por el uso de tractor por tipo de labranza en Estados Unidos.

Tipo de labranza	Soya (l/ha)	Maíz (l/ha)
Labranza intensiva del suelo	49.01	54.5
Labranza de conservación - labranza reducida	38.62	46.98
Cero labranza	21.89	30.09

Fuente: USDA Fuel Estimator 2012.

2.3. Resistencia de maleza a herbicidas.

Los cultivos tolerantes a herbicidas pueden obtenerse por medio de técnicas de mejoramiento convencionales, tales como la mutagénesis y el cultivo *in vitro*, o por medio de las técnicas biotecnológicas de modificación genética. Los cultivos tolerantes a herbicidas derivados de la biotecnología moderna se han cultivado desde el año 1996 e incluyen la soja, la canola, el maíz, el algodón, la alfalfa y la remolacha azucarera. Estos cultivos le ofrecen al productor algunas ventajas diferenciales en el control de las malezas, incluyendo un control más simple, más eficiente, más económico y con menor daño al cultivo y menor residualidad, además de un control de las malezas resistentes existentes, menos labranza y la reducción del impacto ambiental. Sin embargo, los cultivos tolerantes a herbicidas también pueden presentar algunos desafíos para su manejo, como el desarrollo de malezas resistentes a herbicidas (CropLife, 2012).

La dependencia de un único herbicida sin un enfoque de control integrado de malezas puede llevar al cambio de especies de malezas y al desarrollo de malezas resistentes a herbicidas. Los cambios de maleza y los desafíos para el manejo de la resistencia de las malezas en estos cultivos tolerantes a herbicidas son resultado del modo en que se usan dichos herbicidas (CropLife, 2012).

La resistencia a herbicidas se define como la habilidad heredada de una maleza para sobrevivir a una dosis de herbicida con la cual normalmente se tendría un control efectivo. En este contexto, la resistencia es un proceso evolutivo en el que una población cambia de ser susceptible a ser resistente. Las plantas individuales no pasan de ser susceptibles a ser resistentes, sino que es la proporción de individuos originalmente resistentes dentro de la población, la que se incrementa a lo largo del tiempo (Esqueda, *et al.*, 2011).

La resistencia a herbicidas puede deberse a una absorción o translocación diferencial del compuesto químico, a la transformación metabólica del herbicida en compuestos no tóxicos, al secuestro de las moléculas herbicidas en el apoplasto o a una alteración en el sitio de acción. La gran mayoría de los casos de resistencia que se han observado en malezas, se relacionan con una modificación en el sitio de acción (Esqueda, *et al.*, 2011).



Por lo general, la sospecha inicial de resistencia está relacionada con un control deficiente o no satisfactorio de las malezas después de una aplicación de herbicidas. Antes de considerar a la resistencia como causante de la falla, deben descartarse otros factores como: dosis o época de aplicación, aplicación deficiente del herbicida, nivel de humedad y preparación del suelo, adsorción, condiciones climáticas no favorables, tamaño de malezas, germinación posterior a la aplicación y alta infestación (Esqueda, *et al.*, 2011).

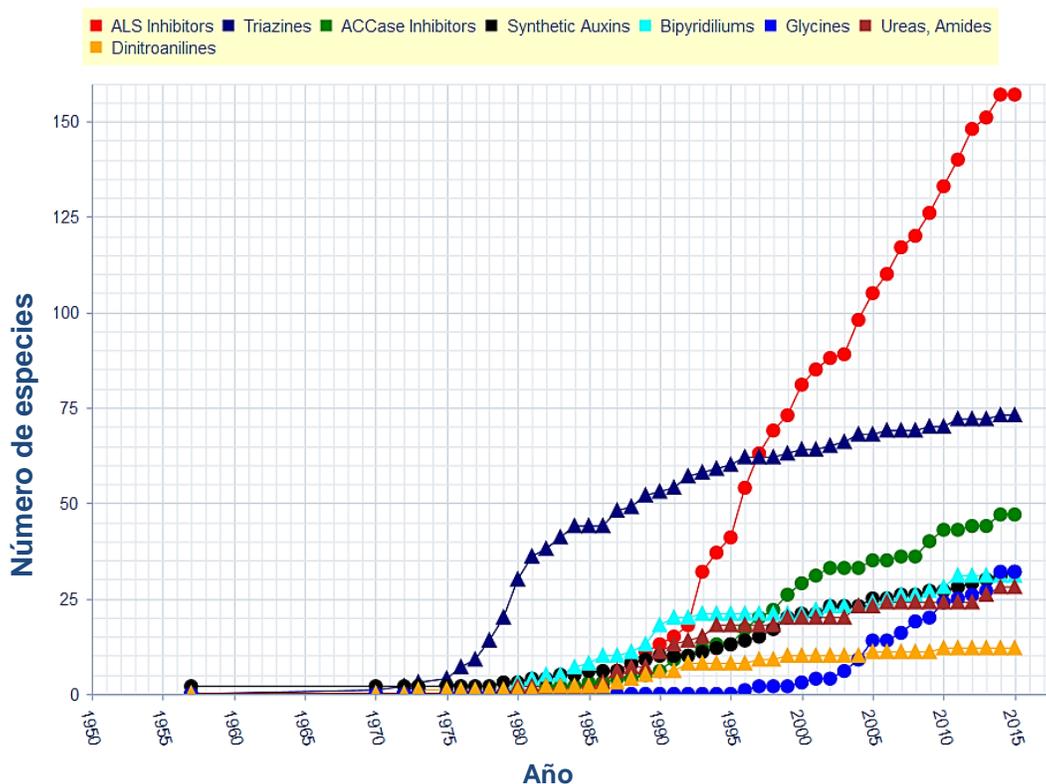
La resistencia a los herbicidas no es un problema que se presente en forma súbita en un terreno en particular, ni es la falta de control de malezas en un solo año. Puede ocurrir primero en una pequeña área o áreas, especialmente en donde se han utilizado herbicidas con el mismo modo de acción por varios años consecutivos. La resistencia a herbicidas se presenta cuando la aplicación repetida de un herbicida, selecciona a plantas individuales con tolerancia natural a dicho herbicida. Esta resistencia se hereda de padres a hijos. Además del uso de herbicidas con el mismo modo de acción, otros factores que favorecen el desarrollo de la resistencia incluyen: uso de herbicidas con alta residualidad en el suelo, alta densidad de población de malezas y frecuencia inicial de plantas resistentes dentro de la especie, algo que generalmente no se conoce. Se piensa que las malezas cambian o mutan para llegar a ser resistentes, sin embargo, desde el punto de vista biológico, se considera que en las poblaciones de malezas en que se desarrolla resistencia, siempre hubo unos pocos biotipos resistentes presentes y que al utilizar un herbicida, los biotipos susceptibles fueron controlados, y luego las poblaciones resistentes pequeñas se incrementaron e infestaron el área (Esqueda, *et al.*, 2011).

Está demostrado que las malezas tienen la capacidad de evolucionar resistencia a herbicidas, sin importar su modo de acción, cuando se someten a suficiente presión de selección bajo condiciones apropiadas. Sin embargo, también es claro considerando la prevalencia de algunos modos de acción sobre otros, que en la evolución de resistencia hay algunos que tienen un menor riesgo (Valverde y Heap, 2009).

A nivel mundial, existen 32 especies de maleza resistentes a glifosato y la mayor cantidad ha sido reportada en Estados Unidos. En México sólo *Leptochloa virgata* ha sido reportada como resistente en huertos de limón en Veracruz en 2010. Respecto a glufosinato de amonio, sólo se han reportado dos casos de resistencia en Malasia y Estados Unidos en hortalizas y huertos. En la [Figura 120](#) se puede observar que existen 157 malezas resistentes a herbicidas inhibidores de ALS, 73 malezas resistentes a inhibidores del fotosistema II, 47 malezas resistentes a inhibidores de ACCasa, etc., los cuales no están relacionados con cultivos GM (Heap, 2015).

Es de vital importancia que el manejo de maleza en cultivos genéticamente modificados y cultivos convencionales, se realice dentro de una estrategia de manejo integrado de maleza, que considere el uso de todas las técnicas de control económicamente disponibles sin depender exclusivamente de una de ellas. Los mecanismos de control de malezas incluyen medidas preventivas, el monitoreo de los lotes, las rotaciones de cultivos, la rotación de herbicidas, la labranza, la competencia de cultivos, las prácticas de fertilización, el riego, etc. (CropLife, 2012).

Figura 120. Incremento cronológico en el número de malezas resistentes a herbicidas pertenecientes a distintos grupos (Heap, 2015).



2.4. Alternativas al uso de algodón tolerante a herbicidas.

Usualmente el manejo de maleza en los cultivos se realiza mediante la combinación de diferentes prácticas agronómicas, en dónde el uso de herbicidas juega un papel muy importante.

Control preventivo. Se refiere a aquellas medidas tomadas para prevenir la introducción, establecimiento y desarrollo de maleza en áreas no infestadas. Estas medidas incluyen: uso de semilla certificada libre de maleza; limpieza de canales de riego y caminos; control del pastoreo de ganado y limpieza de maquinaria después de su uso en zonas infestadas de maleza, especialmente durante la cosecha, cuando existe un gran número de plantas de maleza con semilla madura (Rosales y Sánchez, 2010).

Control cultural. Incluye las prácticas de manejo, tales como: rotación de cultivos; uso de diferentes fechas de siembra; fertilización oportuna y adecuada y uso de surcos estrechos, que promueven un rápido desarrollo del algodón para hacerlo más competitivo hacia la maleza (Rosales y Sánchez, 2010).

Control manual. Consiste en la utilización del azadón para controlar la maleza que se desarrolla entre las plantas de algodón, 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 (Rosales y Sánchez, 2010).

El control manual se facilita en las siembras en surcos, camas o bordos y se sugiere realizarlo después del control mecánico, sobre todo cuando existen malezas como zacate Jhonson o correhuela o bien si la población de maleza es baja y no se justifica la aplicación de herbicidas (Herrera *et al.*, 1988).

Control mecánico. El control mecánico de maleza en algodón se inicia con la preparación de la cama de siembra. La labranza primaria se realiza por medio de arado de discos, subsuelo o bordeadores y posteriormente, la labranza secundaria se efectúa con pasos de rastra.

El sistema de siembra en húmedo o a "tierra venida" elimina el primer flujo de emergencia de maleza y permite establecer el algodón en suelo "limpio". Posteriormente, el paso de escardas con cultivadora rotativa o de picos elimina a la maleza que emerge después de la siembra. El número y época de las escardas depende de factores tales como: presencia de maleza, humedad del suelo y disponibilidad de equipo (Rosales y Sánchez, 2010).

Estas prácticas contribuyen eficazmente en el control de la maleza presente en el terreno, hasta que la altura del cultivo permita el paso de maquinaria, con lo cual se resuelve el problema presente en las calles, sin embargo, el problema de la maleza que se desarrolla entre las hileras de plantas de algodón permanezca. El control mecánico 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.

Control químico. El control químico de maleza mediante el uso de herbicidas es muy común en algodón, ya que tiene la ventaja de eliminar a la maleza en grandes extensiones de una manera eficiente, rápida y económica. Sin embargo, para evitar problemas de selectividad al cultivo o fallas en el control de maleza, el control químico requiere de conocimientos técnicos para la elección y aplicación eficiente y oportuna de los herbicidas y debe efectuarse sólo cuando los otros métodos de control no son factibles de utilizarse o cuando su uso representa una ventaja económica para el productor (Rosales y Sánchez, 2010).

El manejo tradicional de malezas en algodón incluye la siembra en suelo húmedo, el paso de escardas, el uso de herbicidas de pre-siembra incorporados (PSI), pre-emergentes (PRE) y post-emergentes (POST) y los deshierbes manuales. El programa típico de uso de herbicidas en algodón incluye la aplicación de herbicidas como trifluralina y pendimetalina en PSI para el control de gramíneas anuales y malezas de hoja ancha de semilla pequeña como quelite (*Amaranthus* spp.) y verdolaga (*Portulaca oleracea*). Posteriormente, es común la aplicación de fluometuron, el herbicida PRE más común contra malezas de hoja ancha en algodón. Sin embargo, el fluometuron no controla eficientemente a algunas especies de los géneros *Ipomoea* y *Amaranthus*, que son de las malezas más comunes en este cultivo. El control de malezas gramíneas en POST es fácilmente llevado a cabo con la aplicación de herbicidas como sethoxidim, clethodim y fluzifop que muestran una buena selectividad al algodón y un control eficiente de gramíneas anuales y perennes (Culpepper y York, 1998).

La parte más difícil del manejo de malezas en algodón es el control POST de malezas de hoja ancha. Hasta 1995, el control POST de hojas anchas se efectuaba con aplicaciones POST dirigidas a la base de las plantas de algodón de MSMA, DSMA y fluometuron, ya que estos



herbicidas aplicados sobre el algodón comúnmente le causan retraso en su madurez y bajas de rendimiento (Culpepper y York, 1998).

Con la aparición de pirithiobac y trifloxisulfuron para el control POST de hojas anchas en algodón se aumentaron las posibilidades de un manejo eficiente de maleza para los productores (Dotray *et al.*, 1996; Askew y Wilcut, 2002; Richardson *et al.*, 2006). Sin embargo, se descubrió que pirithiobac controla eficientemente a quelites *Amaranthus* spp., suprime *Cyperus*, pero tiene escapes de *Ipomoea*, *Chenopodium album* y *Acalypha ostryifolia* y trifloxisulfuron controla eficientemente a chayotillo *Xanthium strumarium*, chual blanco *Chenopodium album*, altamisa *Ambrosia artemisiifolia* y quelite *A. hybridus*, pero no controla eficientemente a hoja de terciopelo *Abutilon theophrasti*, alache *Anoda cristata* y toloache *Datura stramonium* (Richardson *et al.*, 2006). Además, ambos herbicidas causan daños fitotóxicos al algodón, por lo que la aplicación de trifloxisulfuron se recomienda después del estado de 5ª hoja del algodón, por lo que no puede utilizarse para el control temprano de malezas de hoja ancha.

El control químico requiere de conocimientos técnicos para la elección y aplicación eficiente y oportuna de un herbicida (Rosales *et al.*, 2002). El control químico tiene ventajas importantes sobre los otros métodos de control de maleza: oportunidad en el control maleza, pues la elimina antes de su emergencia o en sus primeras etapas de desarrollo; amplio espectro de control; control de maleza perenne; control residual de la maleza (Rosales y Medina, 2008).

En el Cuadro 67 se presentan los herbicidas recomendados para el control de maleza en el cultivo de algodón en México (PLM, 2014).

Cuadro 67. Ingrediente activo, formulación, dosis, categoría toxicológica y grupo químico de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.

Ingrediente activo (i.a.)	Formulación ^a	Dosis (g i.a./ha)	Grupo químico	Época de aplicación ^b	Tipo de maleza
Alaclor	EC 47.29% (480 g/l)	960 - 2,400	Cloroacetamida	PRE	Hoja angosta
Bensulide	EC 46% (480 g/l)	5,760 - 6,720	Organofosforado	PSI y PRE	Hoja angosta
Clomazone	EC 46.7% (480 g/l)	720 - 960	Isoxazolidinona	PRE	Hoja ancha y angosta
Clortal dimetil (DCPA)	WP 75% (750 g/kg)	7,500 - 9,000	Derivado del ácido benzoico	PRE	Hoja angosta
Diuron	GD 80% (800 g/kg)	640 - 1,000	Dimetilurea	PRE y POST	Hoja ancha
Fluazifop-butil	EC 12.5% (125 g/l)	125 - 500	Arilfenoxi propionato	POST dirigido a la maleza	Hoja angosta
Fluometuron	SC 44% (500 g/l)	1,200 - 3,000	Fenilurea	PRE	Hoja ancha y angosta
Linuron	WP 50% (500 g/kg)	500 - 1,500	Fenilurea	PRE	Hoja ancha y angosta
MSMA	SL 48.3% (336.8 g/l)	1,010 - 1,347	Arsénico orgánico	POST dirigido a la maleza	Hoja angosta
Oxifluorfen	EC 22% (240 g/l)	360 - 480	Difenileter	POST dirigido a la maleza	Hoja ancha y angosta
Pendimetalin	EC 37.4% (396 g/l)	1,386	Dinitroanilina	PSI y PRE	Hoja angosta
Pirithiobac sodio	SP 85% (850 g/kg)	85 - 97.75	Pirimidincarboxy	POST	Hoja ancha



		g/ha			
Prometrina	SC 46.7% (500 g/l)	750 - 1,250	Triazina	PRE	Hoja ancha
Quizalofop-etil	EC 10.3% (105.45 g/l)	42.18 - 73.81	Arilofenoxi propionato	POST dirigido a la maleza	Hoja angosta
Setoxidim	EC 20% (184 g/l)	276 - 552	Ciclohexanediona	POST	Hoja angosta
Clethodim	EC 12.5% (118 g/l)	59.0 – 118.0	Ciclohexanediona	POST	Hoja angosta
Trifluralina	EC 44.5% (480 g/l)	576 - 1,344	Dinitroanilinas	PSI	Hoja ancha y angosta

^a SL: concentrado soluble; WP: polvo humectable; SC: suspensión concentrada; SP: polvo soluble; EC: concentrado emulsionable; P: pellets; GD: Granulos dispersables.

^b POST (Aplicación post-emergente); PRE (Aplicación pre-emergente); PSI (Pre-siembra incorporado).

Desde el punto de vista ambiental, algunos de los herbicidas utilizados para el manejo de maleza en algodón convencional poseen índices de Impacto Ambiental (EIQ) mayores a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato a utilizarse en el algodón GLTC (Cuadro 68).

Cuadro 68. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.

Ingrediente activo (I.A.)	Grupo químico	EIQ
Oxifluorfen	Difenileter	33.82
Pendimetalin	Dinitroanilina	30.17
Fluazifop-p-butyl	Arilofenoxi propionato	28.71
Diuron	Dimetilurea	26.47
Bensulide	Organofosforado	26
Quizalofop-etil	Arilofenoxi propionato	22.14
Piritiobac sodio	Pirimidincarboxy	21.7
Setoxidim	Ciclohexanediona	20.89
Glufosinato de amonio	Ácidos fosfínicos	20.2
Clomazone	Isoxazolidinona	19.63
Linuron	Fenilurea	19.32
Trifluralina	Dinitroanilinas	18.83
MSMA	Arsénico orgánico	18
Alaclor	Cloroacetamida	17.86
Clethodim	Ciclohexanediona	17
Prometrina	Triazina	15.37
Glifosato	Glicinas	15.33
Fluometuron	Fenilurea	14.27

Fuente: A method to measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: list of Pesticides, Part 3: Herbicides 2012. Integrated Pest Management. Disponible en: www.nysipm.cornell.edu

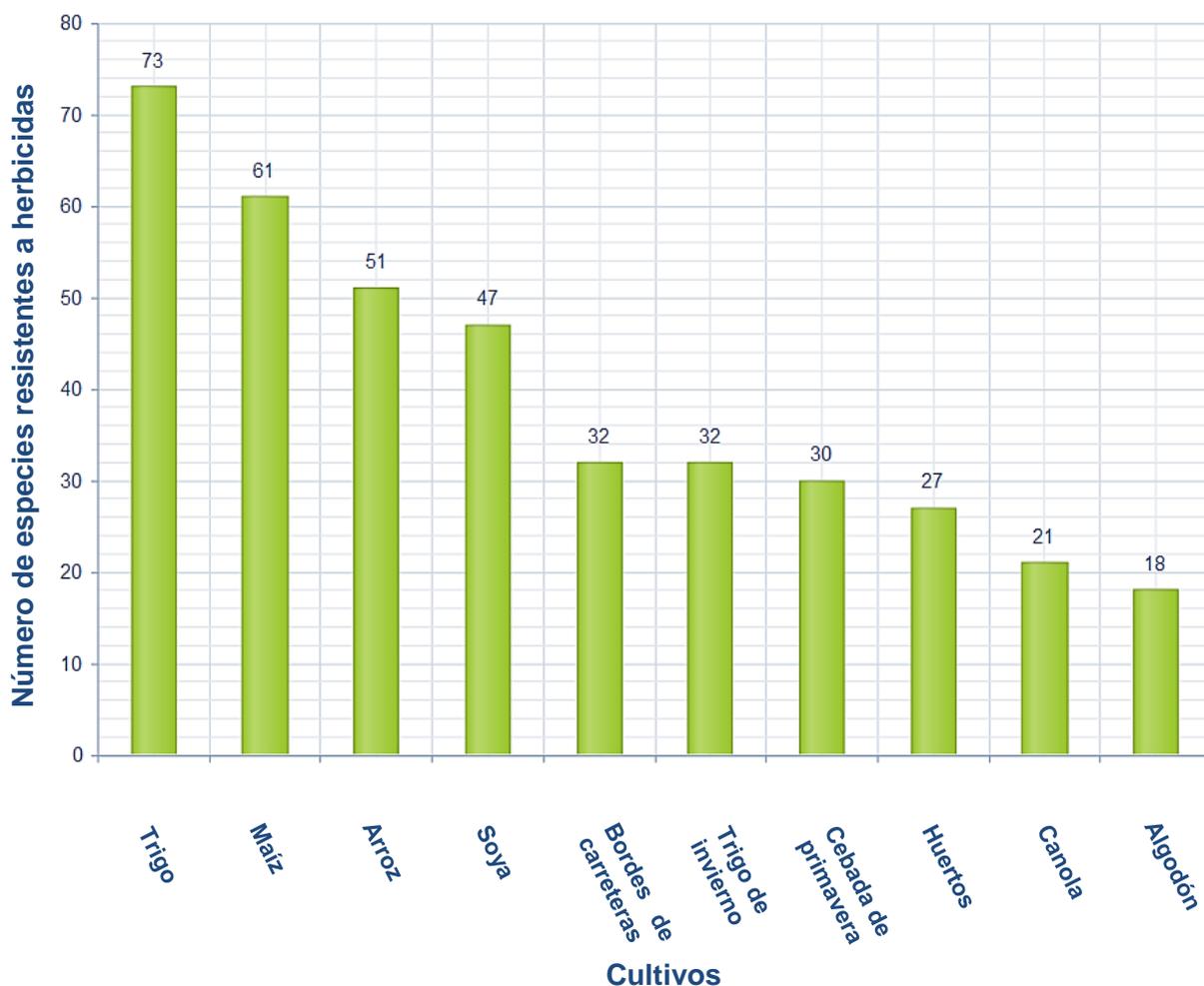
El uso inapropiado de los herbicidas representa algunos riesgos a la agricultura. Sin embargo, todos estos daños son posibles de evitar con una buena selección y aplicación de estos productos y con el conocimiento de sus características específicas (Rosales *et al.*, 2002). Algunos de los posibles riesgos por el uso inadecuado de herbicidas son: daños al cultivo en explotación por dosis



excesiva o a cultivos vecinos por acarreo del herbicida; daños a cultivos sembrados en rotación por residuos de herbicidas en el suelo; cambios en el tipo de maleza por usar continuamente un herbicida; desarrollo de resistencia de malezas a herbicidas (Rosales y Medina, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de resistencia es un fenómeno natural que no está restringido a los cultivos genéticamente modificados tolerantes a herbicidas. En la [Figura 121](#) puede observarse el número de especies resistentes a diferentes herbicidas de acuerdo al tipo de cultivo en los que se han utilizado.

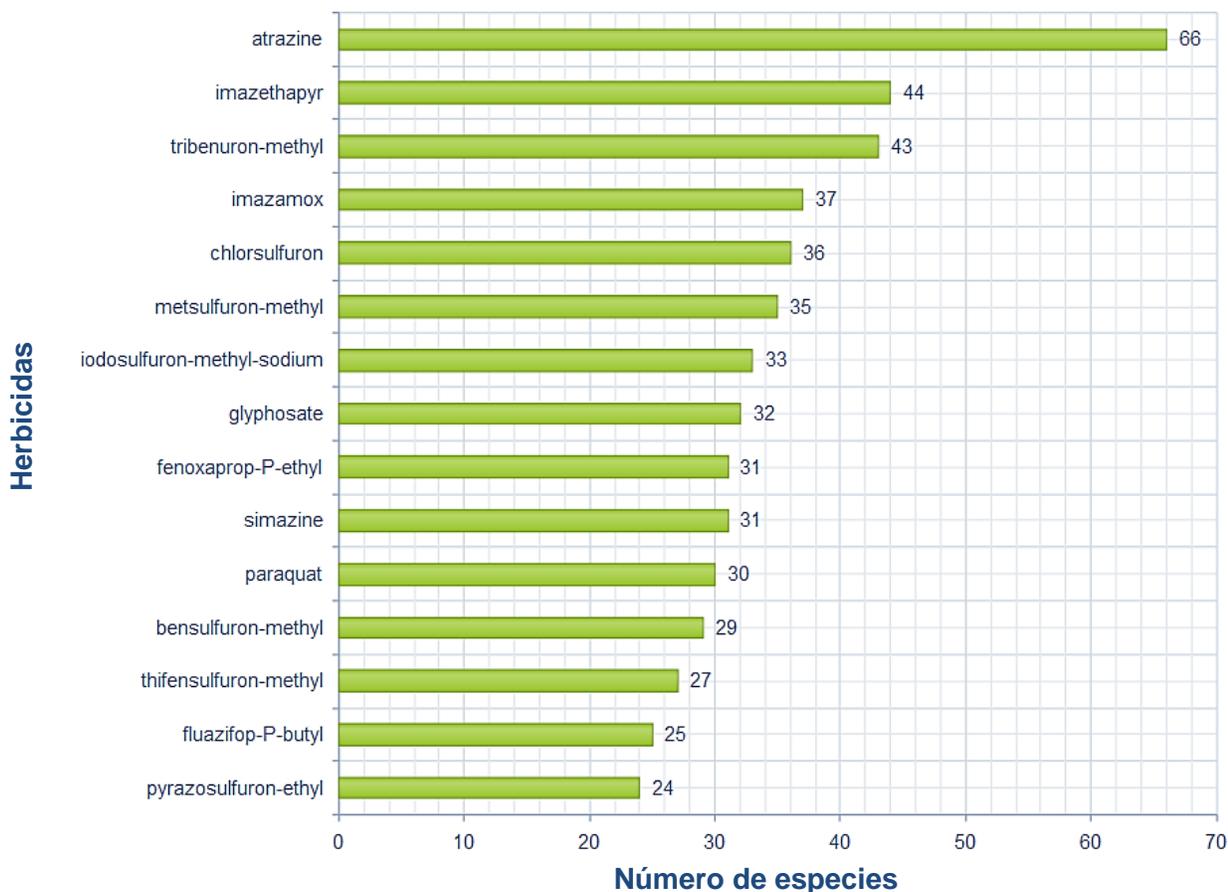
Figura 121. Número de especies resistentes a herbicidas por cultivo (Heap, 2015).



En la figura 4 se puede apreciar que algunos herbicidas son más propensos a generar resistencia en las poblaciones de maleza, debido a sus modos de acción. De los herbicidas mostrados, sólo glifosato está asociado con cultivos genéticamente modificados tolerantes a herbicidas y del número total de especies resistentes reportadas (32), algunos casos han sucedido en cultivos convencionales.



Figura 122. Número de especies resistentes a herbicidas individuales (Heap, 2015).



Los métodos de control anteriormente descritos tienen ventajas y desventajas y se utilizan de acuerdo a las condiciones particulares de cada agricultor, por lo que antes de elegir uno de los métodos o combinación de los mismos, se debe realizar un análisis de la situación para asegurarnos de elegir la mejor alternativa (Cuadro 69).



Cuadro 69. Ventajas y desventajas de los métodos de manejo de maleza.

Método		Ventajas	Desventajas
Manual	Arranque	<ul style="list-style-type: none"> Bajo costo inicial. 	<ul style="list-style-type: none"> Método lento. Gran necesidad de mano de obra. Posibilidad de rebrote.
	Corte manual	<ul style="list-style-type: none"> Menor inversión inicial. 	<ul style="list-style-type: none"> No controla las malezas, las poda. Gran necesidad de mano de obra. Rápida reinfestación (rebrotos vigorosos).
Mecánico	Barbecho y Rastreo	<ul style="list-style-type: none"> Rapidez en la operación. Menor necesidad de mano de obra. Costo final alto. 	<ul style="list-style-type: none"> Método no selectivo No controla maleza en la línea del surco. Su uso depende de la topografía y grado de mecanización del área.
Físico	Quema e Inundación	<ul style="list-style-type: none"> Bajo costo. 	<ul style="list-style-type: none"> Disminución de la fertilidad potencial del suelo. Favorece la germinación e instalación de malezas.
Químico	Herbicidas	<ul style="list-style-type: none"> Selectivo. Versátil. Económico. Alta efectividad. 	<ul style="list-style-type: none"> Inversión alta. Personal calificado. Contaminación. Desarrollo de resistencia.

Fuente: Métodos de control de maleza. Dow AgroSciences. <http://www.dowagro.com/ar/>

3. Plagas del cultivo de algodón.

Entre las principales plagas del cultivo de algodón se tienen al picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman, gusano rosado *Pectinophora gossypiella* (Saunders), gusano bellotero *Helicoverpa zea* (Boddie), gusano tabacalero *Heliothis virescens* (Fabricius), chinche ligus *Lygus hesperus* Knight., *L. Lineolaris* (Palisot de Beauvois) L. elisus, Van Duzee chinche apestosa *Nezara viridula* (L.) y *Chlorochroa* spp, y mosquita blanca *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring. Existe además un complejo de otros insectos chupadores y gusanos que en ocasiones se pueden convertir en serios problemas para el algodónero (Martínez, 2004).

3.1. Complejo bellotero (*Helicoverpa zea*)/ tabacalero (*Heliothis virescens*).

Este complejo de insectos se pueden observar en algodón desde inicio de cuadro hasta bellotas maduras. La hembras de gusano bellotero y tabacalero ponen sus huevos en la terminal de la planta de uno en uno, seleccionan normalmente hojas tiernas de un tercio de desarrollo y botones florales o cuadros. Las larvas emergen e inician su alimentación en la hoja con pequeñas perforaciones luego se mueven para alimentarse de los botones florales y conforme se desarrollan se mueven hacia la parte inferior de la planta. Normalmente se localizan en los primeros cinco nudos de la parte superior de la planta. Pupan en el suelo y de ahí emergen los adultos para realizar migraciones entre cultivos o pueden emprender migraciones a grandes distancias (Westbrook, 1998).

Figura 123. Gusano bellotero (*Helicoverpa zea*).



3.2. Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*).

El gusano cogollero normalmente emigra al algodón de otros cultivos o pastos, se le puede encontrar en algodón desde la emergencia del cultivo pero es más frecuente en el período de floración y desarrollo de bellotas. Las hembras ponen sus huevos en las hojas de la parte terminal en masas cubiertas con escamas como en el caso de gusano soldado, de hecho además de gusano cogollero se le conoce como gusano soldado de otoño. Las larvas recién emergidas presentan hábitos gregarios y canibalismo, conforme se desarrollan emigran a plantas contiguas observándose focos de infestación de esta plaga. Las larvas son de color café claro variando de acuerdo con la alimentación desde verde hasta negro, alcanzan una longitud de hasta 4 cm, las larvas presenta en los costados tres líneas de color amarillo pálido, con bandas de color oscuro y una amarilla y manchas rojizas. En la cabeza se observa una sutura en forma de Y invertida que la distingue de otras especies de lepidópteros. En el octavo segmento abdominal por la parte superior se distinguen ocho protuberancias o tubérculos, de color oscuro cuatro grandes y cuatro más chicos cada uno con una seta o pelo que pueden servir como ayuda para distinguir este insecto de otros lepidópteros. Pupan en el suelo de donde emergen las palomillas para iniciar migraciones de corto o largo alcance como en el caso de gusano bellotero y tabacalero.

Figura 124. Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*).



3.3. Gusano soldado (*Spodoptera exigua*).

El gusano soldado generalmente se presenta en las primeras etapas de desarrollo del cultivo desde que tiene una hoja verdadera hasta inicio de cuadreo, en ocasiones se llega a presentar durante la floración. Las hembras ponen sus huevos en masas cubiertas con escamas de la palomilla, las larvas son de color verde con líneas longitudinales de color claro amarillento y dos puntos negros en el segundo segmento torácico, emergen en forma gregaria y comienzan a dañar las hojas, posteriormente emigran a plantas cercanas, en plantas chicas dañan el follaje y en plantas grandes de algodón pueden encontrarse comiendo en las bellotas y perforando las bellotas.

Figura 125. Gusano soldado (*Spodoptera exigua*).



3.4. Gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*).

El gusano rosado, al igual que otras plagas ha disminuido su importancia como plaga principal del algodonnero, esto se considera que se debe a las campañas de erradicación que se han establecido entre México y Estados Unidos. En ellas se incluyen monitoreo, materiales de algodón *Bt*, liberación de palomillas estériles, feromonas y aplicación de insecticidas.

El adulto de gusano rosado es una palomilla de color café-grisáceo con manchas oscuras, miden 1.8 cm de extensión alar. Las alas son angostas y llevan un fleco de pelos largos en el borde anal, las antenas son filiformes, los palpos labiales son largos y curvos. Viven en promedio 15 días son de hábitos nocturnos o crepusculares. Cada hembra oviposita de 100 a 200 huevecillos en un período de una semana, estos son de color blanco verdoso recién ovipositados y posteriormente adquieren una coloración rosada. Al inicio de la temporada los huevecillos son colocados en las yemas terminales o en los cuadros, cuando ya existen cápsulas los huevecillos son colocados en la parte inferior de las brácteas en pequeños grupos. Las larvas emergen en 5 días siendo en los primeros instares de color blanco cristalino con la cabeza oscura. Cuando se desarrolla en los cuadros se alimenta de la columna estaminal y une con hilos de seda la punta de los pétalos provocando la apertura anormal de la flor formando lo que se conoce con el nombre de flor rosetada. Cuando se desarrolla en las cápsulas, a las cuales penetra inmediatamente después de la eclosión se alimentan de las semillas, dañan la fibra reduciendo su calidad al cortarla o mancharla. Las bellotas dañadas no forman capullo o lo hacen parcialmente. Para completar su desarrollo pasan por cuatro instares larvarios, con una duración de 10 a 15 días. Las larvas de cuarto instar llegan a medir hasta 12 mm de largo son de color rosado con la cabeza café. En este instar, pueden salir de la cápsula haciendo una perforación, para pupar en el suelo, residuos de cosecha, basura y en otros lugares protegidos. Ocasionalmente pupan en el interior de las bellotas de algodón. La duración del ciclo completo es de 25 a 30 días. Las larvas pueden entrar en un período de “diapausa”, debido a condiciones desfavorables o para hibernar. Los adultos que emergen después de la “diapausa” tienen un amplio período de emergencia, lo que les permite atacar la planta de algodón en diferentes etapas de su desarrollo (Martínez-Carrillo *et al.*, 2002).

Figura 126. Gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*).



3.5. Mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*).

La mosquita blanca es una plaga polífaga; es decir que afecta un rango amplio de cultivos hospedantes, entre ellos al algodón. En la Comarca Lagunera la mosquita blanca se constituyó en un problema fitosanitario a partir de 1995, causando pérdidas en la producción (40 al 100%) en cultivos hortícolas y un incremento en el número de aplicaciones en melón, calabaza, tomate y algodón.

La mosquita blanca presenta metamorfosis incompleta pasando por las etapas biológicas de huevecillo, ninfa y adulto. Pueden presentarse seis generaciones durante el ciclo de crecimiento del cultivo. A una temperatura de 30 °C, el huevecillo dura 5.0 días y las ninfas de 1º, 2º, 3º y 4º instares duran 3.2, 1.5, 1.7 y 4.8 días (total estado ninfal, 11.2 días), por lo que el ciclo biológico completo requiere de 16.2 días.

Figura 127. Mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*).



3.6. Picudo del algodón (*Anthonomus grandis* Boheman).

El picudo del algodón es nativo de México y Centroamérica y es considerado como la plaga más destructiva de este cultivo, ya que las pérdidas provocadas por esta plaga pueden ser de 20 a 40% de la fibra cosechada.

El picudo del algodón posee metamorfosis completa, es decir presenta las etapas de huevecillo, larva (gusano), pupa y adulto (picudo). Sobrevive de un ciclo del algodón, hiberna como adulto en refugios, tales como residuos de cosecha y vegetación aledaña a los predios de algodón. Además de los adultos de origen hibernante, se presenta cuatro generaciones normales, durante el ciclo del cultivo.

El ciclo biológico completo, desde huevecillo a emergencia del adulto, dura de 19 a 24 días en el verano en la Comarca Lagunera. El período de pre-oviposición de las hembras dura de 3 a 5 días. El tiempo de una generación requiere de 292 UC > 12°C.

El picudo tiene una alta preferencia para alimentarse en cuadros y bellotas pequeñas.

Figura 128. Picudo del algodnero (*Anthonomus grandis*).



3.7. Conchuela del algodón (*Chlorochroa ligata* Say).

Esta especie es de importancia primaria en el algodón en la Comarca Lagunera y es la chinche que más comúnmente se detecta en la región. Las principales plantas hospederas de conchuela, son mezquite, alfalfa, maíz, sorgo, tomate, frijol, nogal y algunas especies de maleza comunes en la región.

La conchuela posee metamorfosis gradual (insecto hemimetábolo); es decir, presenta las etapas de huevecillo, ninfa y adulto (conchuela). Hiberna como adulto en áreas con maleza o basura. Pueden presentarse cinco generaciones por año y solo se puede completar una generación durante el período crítico del cultivo (80 a 120 días de la siembra). Los huevecillos duran alrededor de 5 días y las ninfas pasan por cinco mudas durante 39 días. Los adultos pueden vivir hasta 55 días.

Tanto las ninfas como los adultos se alimentan succionando los jugos de las bellotas. Las bellotas chicas atacadas se caen y las más grandes permanecen en la planta, y al madurar la fibra se observa manchada y las semillas se chupan (semillas vanas). La conchuela produce verrugas en la cara interna de la pared de la bellota, las cuales son de color blanco e irregulares.

Figura 129. Conchuela del algodón (*Chlorochroa ligata* Say).



3.8. Chinche Lygus (*Lygus* spp.).

La chinche lygus (*Lygus* spp.) es un insecto chupador de 6 mm de largo, oval y color café verdoso, con una marca de color amarillo en el escutelo y varias líneas longitudinales oscuras y claras en el pronoto (Greene *et al.*, 2006). Las ninfas y adultos de estos insectos se alimentan de la savia principalmente en hojas terminales, cuadros y bellotas tiernas. Cuando los daños son intensos al

inicio de cuadro, ocasionan la caída de los cuadrillos recién formados provocando un desarrollo excesivo de ramas y follaje; también causan la mala formación de bellotas, manchan la fibra, bajan el rendimiento y retrasan la cosecha. Este insecto también ataca otros cultivos como alfalfa y cártamo y cuando alcanza altas infestaciones, puede emigrar al algodón durante la etapa del cuadro, complicando así el manejo del cultivo (Herrera Andrade *et al.*, 2010).

Figura 130. Chinche Lygus (*Lygus* spp.).



3.9. Trips.

Los trips son insectos pequeños de alrededor de 1 mm, existen más de 5000 especies reportadas pero solo algunas son consideradas plagas de cultivos; son de cuerpo delgado y alargado, aparato bucal raspador chupador y alas con flecos en los bordes. Las especies que se han reportado en algodón son *Frankliniella tritici*, *Frankliniella occidentales*, *Frankliniella fusca*, *Neohydatothrips variabilis* y *Thrips tabaci*.

El ciclo de vida de los trips pasa por 6 instares: huevo, dos estados larvales, pre-pupa pupa y adulto. Los estados de pre-pupa y pupa permanecen en el suelo, las larvas son las más dañinas para las plantas. Su ciclo varía con la temperatura de 15 hasta 60 días; con frío los estados inmaduros duran más tiempo y producen más daño.

Los trips hibernan como adultos o larvas en plantas de invierno o como pupas en el suelo. Comienzan su reproducción en maleza, cultivos de invierno entre otros en trigo, después emigran a algodonerero. La principal forma de dispersión es el viento; la dirección y velocidad del viento tiene mucha influencia en las infestaciones en algodonerero.

Afectan plántulas desde emergencia hasta la cuarta hoja. Los inmaduros son los más dañinos y el frío prolonga ciclo y daño. Dañan la yema terminal, interfieren con el desarrollo normal de la planta, reduciendo su tamaño, deformando hojas y tallos y reduciendo la capacidad fotosintética de la planta. Los cultivos sembrados bajo condiciones de frío son más afectados.

Figura 131. Daño por trips en el cultivo de algodón.



3.10. Pulgón del algodón (*Aphis gossypii*).

El pulgón del algodón pasa la mayor parte del año en la maleza y emigra al algodón al inicio del ciclo del cultivo. La infestación puede incrementarse a través del ciclo del algodón y causar problemas de “enmielado” de hojas y fibra. Los pulgones se alimenta de la savia de hojas y ramas y son vectores importantes de virus fitopatógenos. Solamente las hembras se encuentran en el algodón y su reproducción es partenogenética, presentándose una nueva generación aproximadamente cada 15 días.

Figura 132. Pulgón del algodón (*Aphis gossypii*).



4. Algodón genéticamente modificado resistente a insectos.

Bacillus thuringiensis es una bacteria que normalmente habita el suelo y durante el proceso de esporulación produce una inclusión formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados especialmente larvas de insectos. Estas proteínas se llaman Cry y constituyen la base del insecticida biológico más difundido en el mundo (Sauka y Benintende, 2008).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño per se, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva (Bravo *et al.*, 2004).



A través de la ingeniería genética se han desarrollado muchas especies de plantas que expresan genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* y comúnmente se hace referencia a este tipo de plantas como “plantas o cultivos Bt” (por ejemplo, maíz Bt, algodón Bt, etc.). El primer informe de una planta transgénica con un gen *cry* de *B. thuringiensis* data de 1987 (Vaek *et al.*, 1987). Se desarrollaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que producían cantidades suficientes de proteína Cry para controlar larvas de primer estadio de *Manduca sexta*.

El algodón transgénico se sembró en México desde 1996 año en que se establecieron 896.8 ha en Tamaulipas, correspondiendo a un 0.3% de la superficie sembrada a nivel nacional (Martínez-Carrillo, 2004). Actualmente el algodón genéticamente modificado tolerante a herbicidas y resistente a insectos lepidópteros representa más del 90% del total nacional.

El algodón GLTC expresan las proteínas insecticidas Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki, Cry2Ae de *Bacillus thuringiensis* subsp. Dakota y VIP3A de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88, las cuales son específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodón. La expresión de tres proteínas insecticidas en una misma planta, contribuye a reducir el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo contra múltiples toxinas.

Con relación al manejo agronómico, la adopción de algodón biotecnológico resistente a insectos ha contribuido a la adopción de mejores prácticas agrícolas que han redundado en importantes beneficios económicos y ambientales (Brookes y Barfoot, 2012):

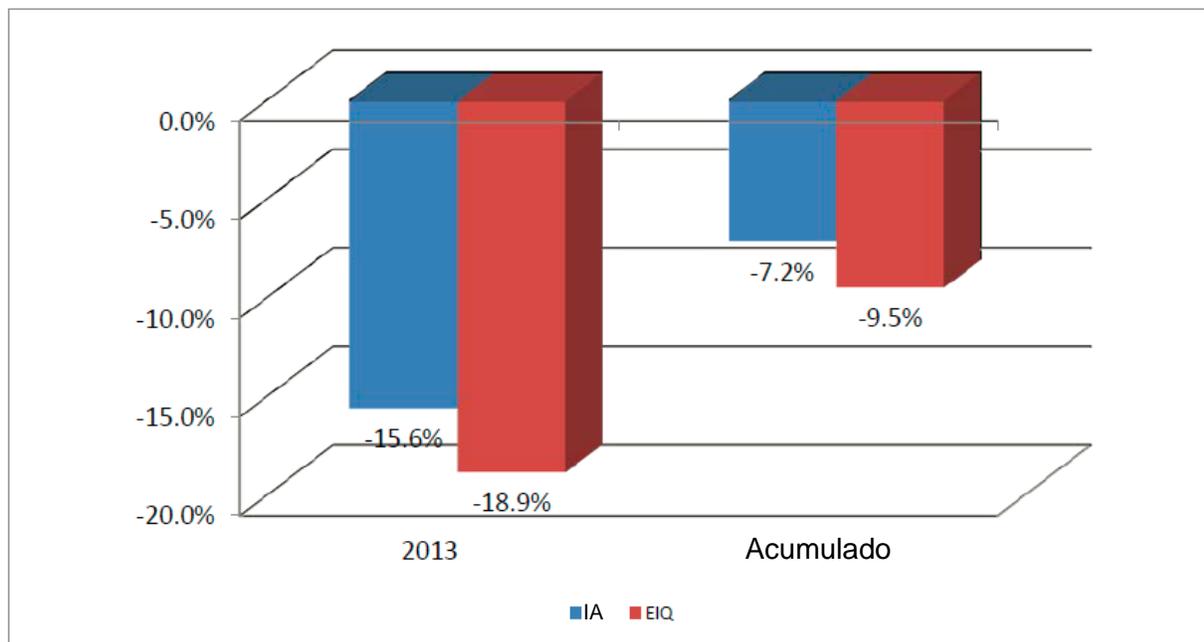
- Mayor espectro de control de insectos lepidópteros plaga.
- Aumento de rendimiento debido al control efectivo de las plagas blanco que atacan al cultivo.
- Reducción significativa en el uso de insecticidas químicos (Figura 133).
- Disminución de la contaminación del suelo y mantos freáticos al utilizar insecticidas con menor impacto ambiental (Cuadro 70).
- Menor impacto en las poblaciones de insectos benéficos y otros organismos no blanco, debido a su especificidad y a que los únicos insectos expuestos a las toxinas son aquellos que se alimentan de los cultivos.
- Compatibilidad con prácticas de manejo integrado de plagas (MIP).
- Reducción de la emisión de gases de efecto invernadero (disminución en el uso de combustibles necesarios para la fabricación, transporte y aplicación de insecticidas).

Desde 1996, el impacto neto en el uso de insecticidas y la huella ambiental (en relación con lo que podría haberse esperado, si todas las plantaciones de algodón se hubieran sembrado con algodón convencional), en los principales países que han adoptado algodón resistente a insectos ha sido:

- En 2013, una disminución de 44.3% en el volumen total de I.A. insecticida aplicado (20.6 millones de kg) y una reducción de 48.2% en el impacto ambiental (medido en términos de EIQ/ha).
- Desde 1996, se ha usado un 26.6% menos de I.A. insecticida (227.5 millones de kg) y el impacto ambiental debido a la aplicación de insecticidas en algodón se redujo un 29.4%.



Figura 133. Reducción en el uso de herbicidas y la carga ambiental derivado del uso del algodón GM tolerante a herbicidas en Estados Unidos, Australia, Argentina y Sudáfrica 1997-2013 (Brookes y Barfoot, 2015).



Cuadro 70. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.

Ingrediente activo (I.A.)	Grupo químico	EIQ
Oxifluorfen	Difenileter	33.82
Pendimetalin	Dinitroanilina	30.17
Fluazifop-p-butil	Arilofenoxi propionato	28.71
Diuron	Dimetilurea	26.47
Bensulide	Organofosforado	26
Quizalofop-etil	Arilofenoxi propionato	22.14
Pirithiobac sodio	Pirimidincarboxy	21.7
Setoxidim	Ciclohexanediona	20.89
Glufosinato de amonio	Ácidos fosfínicos	20.2
Clomazone	Isoxazolidinona	19.63
Linuron	Fenilurea	19.32
Trifluralina	Dinitroanilinas	18.83
MSMA	Arsénico orgánico	18
Alaclor	Cloroacetamida	17.86
Clethodim	Ciclohexanediona	17
Prometrina	Triazina	15.37
Glifosato	Glicinas	15.33
Fluometuron	Fenilurea	14.27

Fuente: A method to measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: list of Pesticides, Part 3: Herbicides 2012. Integrated Pest Management. Disponible en: www.nysipm.cornell.edu



5. Resistencia de insectos.

La resistencia es una característica de fundamento genético que permite a un organismo sobrevivir a la exposición con una dosis de un plaguicida que normalmente podría resultar letal. Los genes de resistencia ocurren naturalmente en plagas individuales debido a mutaciones genéticas y de carácter hereditario. Los genes se diseminan a través de las poblaciones de plagas debido a un proceso de selección provocado por el uso repetido del plaguicida. Las poblaciones resistentes se desarrollan debido a que los individuos resistentes sobreviven y se reproducen posteriormente, y el rasgo de resistencia es “seleccionado” en la siguiente generación, mientras que los individuos susceptibles son eliminados por el tratamiento plaguicida. Si se continúa con el tratamiento, el porcentaje de sobrevivientes aumentará y la susceptibilidad de la población declinará hasta un punto que el plaguicida no podrá más proporcionar un nivel aceptable de control (FAO, 2012).

A lo largo del último siglo, cientos de especies de insectos han desarrollado resistencia a una o más medidas de control, impactando severamente en la economía de la producción de los cultivos (Cuadro 71). La mayoría de los casos de resistencia de insectos hasta la fecha involucra insecticidas químicos sintéticos (Yu, 2008), pero también se ha desarrollado resistencia a algunos agentes microbianos, tales como las formulaciones para aspersión de Bt (Ferré and Van Rie, 2002).

Cuadro 71. Los 20 artrópodos más importantes, para los cuales se han registrado casos de resistencia en la agricultura y la salud pública.

Orden	Familia	Especies	Rango de hospedantes	Hospedante
Acari	Acaridae	<i>Rhizoglyphus robini</i>	19	Plantas ornamentales, cebolla almacenada
Acari	Ixodidae	<i>Boophilus microplus</i>	6	Ganado bovino
Acari	Tetranychidae	<i>Panonychus ulmi</i>	9	Arboles frutales
Acari	Tetranychidae	<i>Tetranychus urticae</i>	1	Algodón, flores, frutales, hortalizas
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	4	Papa, berenjena, tomate
Coleoptera	Tenebrionidae	<i>Tribolium castaneum</i>	17	Granos almacenados, cacahuate, sorgo
Dermaptera	Blattellidae	<i>Blattella germanica</i>	7	Urbano
Diptera	Calliphoridae	<i>Lucila cuprina</i>	18	Ganado bovino y ovino
Diptera	Culicidae	<i>Anopheles albimanus</i>	20	Humano
Diptera	Culicidae	<i>Culex pipiens pipiens</i>	11	Humano
Diptera	Culicidae	<i>Culex quinquefasciatus</i>	15	Humano
Diptera	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	5	Urbano
Hemiptera	Aleyrodidae	<i>Bemisia tabaci</i>	8	Algodón, cucurbitáceas, crucíferas y hortalizas
Hemiptera	Aphididae	<i>Aphis gossypii</i>	10	Algodón, hortalizas
Hemiptera	Aphididae	<i>Myzus persicae</i>	3	Frutales, hortalizas, árboles
Hemiptera	Aphididae	<i>Phorodon humuli</i>	12	Lúpulo, ciruela
Lepidoptera	Noctuidae	<i>Helicoverpa armigera</i>	13	Algodón, maíz, tomate



Lepidoptera	Noctuidae	<i>Heliothis virescens</i>	14	Garbanzo, algodón, maíz, tomate
Lepidoptera	Noctuidae	<i>Spodoptera littoralis</i>	16	Alfalfa, algodón, papa, hortalizas
Lepidoptera	Noctuidae	<i>Plutella xylostella</i>	2	Crucíferas

Fuente: Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State University. Disponible en: <http://www.pesticideresistance.org/search.php>

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.

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).

La resistencia puede y ha evolucionado a todas las formas de manejo de plagas, incluyendo las herramientas químicas, biológicas y culturales, y no es una preocupación única a los cultivos GM. Sin embargo, los beneficios de las características GM de protección contra insectos se consideran tan valiosas que los proveedores de la tecnología y otros actores involucrados han puesto especial énfasis en prolongar su durabilidad retrasando la tasa de desarrollo de la resistencia en los insectos blanco. Se dispone de múltiples tácticas para preservar la durabilidad de las tecnologías de manejo de insectos, incluyendo el uso de la tecnología solo contra las poblaciones de plagas económicamente más dañinas, alternando entre diferentes tácticas de control, o integrando múltiples tácticas en un programa de manejo de plagas (CropLife, 2012).

El objetivo del manejo de la resistencia es retrasar la evolución de la resistencia en las poblaciones de la plaga expuestas a la herramienta de control, por lo que el plan de manejo de resistencia (MRI) deberá constituirse con las técnicas disponibles (CropLife, 2012):

- Alta dosis/refugio



- Monitoreo de los predios y aplicación de insecticidas acorde a las necesidades.
- Rotación de insecticidas con diferente modo de acción.
- Uso de medidas de control suplementarias que otorguen un manejo adicional de plagas.
- Combinación dentro de una planta múltiples eventos que tengan como blanco las mismas plagas (pyramiding).
- Establecimiento de la línea base y monitoreo de susceptibilidad.
- Destrucción de los residuos de cosecha.

6. Alternativas al uso de algodón GM resistente a insectos.

El control de plagas en el cultivo de algodón se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro (**Cuadro 72**), debido a que es el método más efectivo que existe. Sin embargo, el uso inadecuado de los mismos ha generado un impacto negativo en el agroecosistema, ocasionando una disminución drástica de los enemigos naturales y el desarrollo de resistencia a un gran número de insecticidas (Pacheco, 1994; Hake *et al.*, 1996; Machain *et al.*, 1988; Machain *et al.*, 1995).

Cuadro 72. Ingrediente activo, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos plaga en algodón (PLM, 2014).

Ingrediente activo	Formulación ^a	Dosis (g i.a./ha)	Categoría Toxicológica	Grupo Químico
Acefate	P 97% (970 g/kg)	1,164 - 1,552	Ligeramente tóxico	Organofosforado
Azinfos metilico	WP 35% (350 g/kg)	315 - 490	Altamente tóxico	Organofosforado
Betaciflutryn	SC 11.8% (125 g/L)	18.75 - 25	Ligeramente tóxico	Piretoride
Bifentrina	EC 12.15% (100 g/L)	40 - 60	Ligeramente tóxico	Piretroide
Carbaril	WP 80% (800 g/kg)	1,200 - 2,400	Moderadamente tóxico	Carbamato
Cipermetrina	EC 19.6% (200 g/L)	80 - 120	Moderadamente tóxico	Piretroide
Clorfenapir	SC 21.44% (240 g/L)	120 - 360	Ligeramente tóxico	Halogenado de Pirrol
Clorpirifos etil	EC 44.5% (480 g/L)	480 - 840	Moderadamente tóxico	Organofosforado
Cyflutrin	EC 5.7% (50 g/L)	37.5 - 50	Ligeramente tóxico	Piretroide
Deltametrina	EC 2.8% (25 g/L)	12.5	Ligeramente tóxico	Piretroide
Endosulfán	EC 33.30% (360 g/L)	540 - 900	Altamente tóxico	Organoclorado
Fenpropatrin	EC 38.50% (375 g/L)	168.75 - 225	Altamente tóxico	Piretroide
Fenvalerato	EC 11.1% (100 g/L)	0.075	Ligeramente tóxico	Piretroide
Fluvalinato	E en agua 24% (240 g/L)	72 - 120	Moderadamente tóxico	Piretroide
Imidacloprid	SC 21.4% (240 g/L)	103.2 - 208.8	Ligeramente tóxico	Neonicotinoide
Lambda cyalotrina	EC 5 % (50 g/L)	20 - 30	Ligeramente tóxico	Piretroide
Malation	EC 83.7% (100 g/L)	70 - 200	Ligeramente tóxico	Organofosforado
Metidation	EC 40% (415 g/L)	415 - 830	Altamente tóxico	Organofosforado
Metomilo	SP 90% (900 g/kg)	225 - 360	Altamente tóxico	Carbamato



Monocrotofos	Líquido miscible 56% (600 g/L)	300 - 900	Extremadamente tóxico	Organofosforado
Paratión metílico	EC 47.4% (500 g/L)	500 - 1,500	Extremadamente tóxico	Organofosforado
Permetrina	EC 33.66% (340 g/L)	136 - 204	Moderadamente tóxico	Piretroide
Profenofos	EC 73.56% (960 g/L)	576 - 1152	Moderadamente tóxico	Organofosforado
Spinosad	SC 44.2% (480 g/L)	36 - 60	Ligeramente tóxico	Derivado de fermentación bacteriana (Naturalyte)
Thiodicarb	SC acuosa 33.7% (375 g/L)	562.5 - 1125	Moderadamente tóxico	Carbamato
Triazofos	EC 40.0% (420 g/L)	630	Altamente tóxico	Organofosforado

^a SL: concentrado soluble; WP: polvo humectable; SC: suspensión concentrada; SP: polvo soluble; EC: concentrado emulsionable; P: pellets.

En México, antes de la década de los 60's, al algodón se le conocía como el oro blanco debido a que ocupaba una gran cantidad de mano de obra y representaba una fuente de ingresos importante para los agricultores. En la década de los 60's, solamente en el estado de Tamaulipas se sembraban 630, ha (Vargas *et al.*, 1979). Desafortunadamente, el combate de las plagas de este cultivo se sustentó en aplicaciones calendarizadas de insecticidas, aumentos frecuentes en las dosis y en el número de aplicaciones por temporada; a principios de la década de los 70's, en el cultivo de algodón se aplicaba el 80% de todos los insecticidas que se empleaban en la agricultura mexicana. Este escenario favoreció el desarrollo de resistencia a insecticidas y por ende que este cultivo entrará en fase de crisis a nivel nacional (Lagunes 1992).

En las décadas de los 60's y 70's, la resistencia a insecticidas de varias plagas de insectos provocaron la desaparición de las zonas algodonerías de Apatzingán, Michoacán, Tapachula, Chiapas y Matamoros, Tamaulipas (Lagunes, 1992). La zona de Tamaulipas se recuperó lentamente para sufrir otra crisis debido a la resistencia a insecticidas piretroides en el gusano tabacalero *Heliothis virescens* (Fabricius) a mediados de la década de los 90's (Terán-Vargas, 1996).

Dentro de un escenario de elevados niveles de resistencia a insecticidas convencionales, la introducción del algodón transgénico, que expresa la δ -endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* Berliner (Bt) (Perlak *et al.*, 1990, 1991) representó una alternativa viable para cultivar algodón (Terán-Vargas *et al.*, 2005). Posteriormente se introdujo el algodón que expresaba dos proteínas Bt (Cry1Ac y Cry2Ab) que contribuyó a mejorar el control de los lepidópteros plaga del cultivo y a retrasar el desarrollo de resistencia.

7. Literatura consultada.

- Andow, D. A. 2008. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops Collection of Biosafety Reviews. Vol. 4: 142-199.
- Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1667: 38-46.



- Brookes, G. and Barfoot. 2015. GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2013.
- CropLife, 2012. Implementación del Manejo Integrado de Malezas para los Cultivos Tolerantes a Herbicidas. CropLife Internacional.
- CropLife, 2012. Enfoques prácticos del Manejo de la Resistencia de los Insectos para los Cultivos Derivados de la Biotecnología. CropLife Internacional.
- Culpepper, A. S. and A. C. York. 1998. Weed management in glyphosate-tolerant cotton. *J. Cotton Sci.* 2:174-185.
- Dotray, P. A., J. W. Keeling, C. G. Henniger and J. R. Abernathy. 1996. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and devil's-claw (*Proboscidea louisianica*) control in cotton with pyriithiobac. *Weed Tech.* 10:7-12.
- EPA, 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant Incorporated Protectans. Biopesticides Registration Action Document. U.S. Environmental Protection Agency.
- Esqueda, E.V. A., Zita, P.G.A., Rosales, R. E. 2011. Resistencia a herbicidas. XXXIV Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza - IV Simposio Internacional de Resistencia y Tolerancia a Herbicidas (ASOMECEIMA).
- FAO, 2012. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas.
- Ferré, J., Real, D.M., Van Rie, J., Jansens, S., and Peferoen, M. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc Nat Acad Sci, USA* 88:5119-5123.
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D.G., 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3519–3523.
- Greene, J.K.; Scott Bundy C.; Phillip M. Roberts; Roger Leonard, B. 2006. Identification and management of common boll-feeding bugs in cotton. Clemson University, Louisiana State University, New Mexico State University and the University of Georgia. Cotton Incorporated.
- 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.
- Heap, I. 2015. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://weedsscience.org/?aspxerrorpath=/summary/%20home.aspx/>
- Herrera, A.J.L., López, L.F., Valenzuela, P.J.A., Machain, L.M. 1988. Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali y San Luis Río Colorado. INIFAP “Campo Experimental Mexicali” CIR – Noroeste.
- Herrera Andrade, J.L.; Guzmán Ruiz, S.C.; Loza Venegas, E. 2010. Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali, B.C. y San Luis Río Colorado, Son. INIFAP-CIRNO. Mexicali, B.C.
- Lagunes, T. A. 1992. Perspectivas en el uso de insecticidas agrícolas en México, pp. 1-22. In A. Lagunes y J. C. Rodríguez [eds.], Temas selectos de manejo de insecticidas agrícolas. Volumen I. Colegio de Postgraduados. México.
- Liu, Y.B., Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Patin, A.L. & Bartlett, A.C. 1999. Development time and resistance to Bt crops. *Nature* 400: 519.
- Machain L. M.; Diaz Talamante, F.; Guzman Ruiz, S. 1988. Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali. INIFAP Campo Agrícola Experimental Valle de Mexicali.
- Martínez, C.J.L. 2004. Evolución del algodón transgénico en México. VII congreso Internacional en Ciencias Agrícolas UABC.



- Martínez, C.J.L.; Pacheco, C.J. 2004. Guía para el manejo de insecticidas contra plagas del algodón en el sur de Sonora. INIFAP, Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Valle del Yaqui. Ciudad Obregón, Son.
- Martínez, C.J.L.; Pacheco, C.J. Hernandez J. A. 2002. Manejo Integrado de plagas del algodón en el sur de Sonora. Folleto técnico No.46. INIFAP. CIRNO. 69 pp.
- Niles, G.A. and Feaster, C.V. 1984. Cotton Agronomy No. 24, P. 205, Soil Science Society Of America, Inc. (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, Eds.), Wisconsin, USA.
- Pacheco, M. F. 1994. Plagas de los cultivos oleaginosos en México. INIFAP - Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO).
- Paulsgrove, M. D., W. L. Barker and J. W. Wilcut. 2005. Bromoxynil-resistant cotton and selected weed response to mixtures of bromoxynil and pyriithiobac. *Weed Tech.* 19:753-761.
- Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, and D. A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants *Bio Technology.* 8: 939-943.
- Perlak, J. F., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R. Voth, S. Sivasupramaniam, D. Heering, B. Carey, R. A. Ihrig, and J. K. Roberts. 2001. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA early promises versus today's reality. *The Plant J.* 27: 489-501.
- PLM. 2014. Diccionario de especialidades agroquímicas. 16 Edición. Thomson PLM. México, D.F.
- Richardson, R. J., H. P. Wilson, G. R. Armel and T. E. Hines. 2006. Trifloxysulfuron plus pyriithiobac mixtures for broadleaf control in cotton. *Weed Tech.* 20:130-136.
- Rosales, R.E. 2013. Análisis del uso actual del algodón resistente a Glifosato en México. IV Simposio Internacional de Resistencia y Tolerancia a Herbicidas.
- Rosales, R.E., T. Medina C., E. Contreras C., L.M. Tamayo E. y V. Esqueda E. 2002. Manejo de maleza en maíz, sorgo y trigo bajo labranza de conservación. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Río Bravo. Folleto Técnico 24. Tamaulipas, México. 81 pp.
- Rosales, R.E., Medina, C.T. 2008. Manejo de maleza en cultivos básicos. Memoria XXIX Congreso de la ASOMECEMA A.C. Tapachula, Chiapas, México.
- Rosales, R. E., Sánchez, D. R. 2010. Manejo de maleza en algodón en el norte de Tamaulipas. INIFAP "Campo Experimental Río Bravo".
- Rosales, R. E., Esqueda, E. V.A. 2013. Cultivos genéticamente modificados con resistencia a herbicidas. Avances en el manejo y control de malezas en México. ASOMECEMA 66-82.
- Roush, R.T. and Miller, G.L. 1986. Considerations for design of insecticide resistance monitoring program. *Journal of Economic Entomology*, 79, 293J298.
- Sauka, D.H., Benintende, G.C. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 124-140.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomo* 39:47–79.
- Tabashnik, B.E., Patin, A.L., Dennehy, T.J., Liu, Y.B., Carriere, Y., Sims, M.A. & Antilla, L. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 12980–12984.
- Terán-Vargas, A. P. 1996. Insecticide resistance of tobacco budworm in the Southern Tamaulipas, México, pp. 784-786. In Proc. Beltwide Cotton Conference, 9-12 January 1996, Nashville, TN. National Cotton Council of America, Memphis, TN.
- Valverde, M.B. E., Heap, I.M. 2009. El estado actual de la resistencia a herbicidas en el mundo. Seminario Internacional: Diagnóstico y manejo de la resistencia a herbicidas Serie Actas INIA; No. 44).
- Vargas, C. J. E., F. Villarreal, y E. Salgado. 1979. Líneas de algodón resistente al ataque del complejo bellotero *Heliothis* spp en el sur de Tamaulipas. *Agríc. Tec. M ex.* 5: 11-19.



Vaeck M, Reynaerts A, Höfte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean D, et al. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 1987; 328: 33-7.
Yu, S.J.2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press, Boca Raton, FL.

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

El algodón GLTC (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7) es exclusivamente para uso agrícola.

El algodón GLTC combina la expresión de las proteínas insecticidas Cry1Ab (T304-40), Cry2Ae (GHB119) y Vip3Aa19 (COT102) para un control más eficiente de insectos lepidópteros plaga del algodón y representa una nueva herramienta para prevenir el desarrollo de resistencia en los insectos. Asimismo, combina la expresión de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (T304-40/ GHB619) que confieren tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, permitiendo el uso de dos mecanismos de acción herbicida para un manejo más eficiente de la maleza en el cultivo del algodón, esta combinación de mecanismos de acción es particularmente importante para el manejo y prevención de resistencia de las especies de maleza a los herbicidas.

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

Se solicita el permiso para el ciclo agrícola PV-2016. Este periodo incluye actividades previas a la siembra del algodón GLTC (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7) tales como planeación de los estudios a realizar e importación de la semilla, el ciclo agrícola hasta la finalización del ensayo.

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 85kg que ingresaran por la aduana en Cd. Juárez, Chihuahua o Nuevo Laredo, Tamaulipas.

1. Importación y almacenamiento de la semilla.

La importación de la semilla se realizará siguiendo el procedimiento establecido en el documento **SOP-IMM-001 Importación de semilla** Todos estos formqrts son considerados como **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**, en dónde se describe la metodología, evaluación y los controles del proceso de importación.

- Una vez que se cuenta con el permiso de liberación al ambiente correspondiente, se consulta el Modulo de Requisitos Fitosanitarios (<http://www.senasica.gob.mx/?id=5145>) y se imprimen las Medidas Fitosanitarias de Importación (MFI) de acuerdo al tipo de producto, origen y



procedencia del mismo. A la par de lo anterior, el departamento de Comercio Internacional deberá de realizar la “solicitud del trámite de importación SENASICA” en la VU - Ventanilla única (<http://www.ventanillaunica.gob.mx/>).

- Posteriormente se informa de la importación de la semilla de acuerdo al registro **RG-CMM-003 Plan de importación**. Una vez iniciadas las importaciones se hace un monitoreo de las cantidades y lotes a través del registro **RG-CMM-022 Variedades por número de lote**.
- Una vez que se cuenta con la liberación de importación el Departamento de Logística coloca la orden de compra (*Purchase Order*) para el país exportador en SAP³⁵.
- Una vez que se cuenta con el permiso de siembra y el Certificado de Importación generado a través de la VU - Ventanilla única (<http://www.ventanillaunica.gob.mx/>), el Departamento de Comercio Internacional comienza el proceso de importación. De igual manera, realiza la liberación y el envío a la Aduana correspondiente de la cantidad de semilla solicitada, acompañando el embarque con la documentación necesaria y la establecida en la MFI.
- El Departamento de Comercio Internacional a través del Agente Aduanal contratado para tal fin, realiza la liberación de la semilla de la aduana; en caso de cualquier contratiempo o que se requiera algún tipo de aclaración, el Coordinador responsable del Dpto. de Comercio internacional lo comunicará inmediatamente a la Gerencia de Negocio y Asuntos Regulatorios, en caso de ser necesaria documentación adicional ésta será provista por la gerencia correspondiente.
- Una vez liberada la semilla de la aduana esta se envía al almacén de Bayer ubicado en Delicias, Chih. Cuando la semilla llega a su destino, el responsable del almacén revisa el embarque y procede a darle ingreso en el sistema SAP y en físico.

El almacenamiento se realiza siguiendo las acciones establecidas en el documento **WI-RCM-002 Etiquetado y almacenamiento de muestras de semilla regulada**, cuyo propósito es instruir a las personas involucradas sobre el correcto almacenamiento e identificación de materiales, así como cumplir con la directriz **GPS 12.01 Preservation of Product Genetic Integrity and Traceability of Seeds and Traits**.

- Después de que la semillas son ingresadas a la bodega se deberá proceder a actualizar los respectivos inventarios, tomando el peso bruto del material que ingresa, el estado del paquete y la persona que lo hace.
- Los materiales a utilizar con fines experimentales deberán ser almacenados en un lugar separado, con acceso restringido y bajo llave e indicando claramente: semilla regulada, la variedad, el evento, el lote. Los materiales no experimentales podrán ser almacenados en el mismo sitio donde se tienen convencionales, pero separados y correctamente identificados.
- Las personas autorizadas para ingresar a la bodega deberán llenar el formato de registro de entrada y salida de personal e indicar el motivo.

³⁵ SAP (Sistemas, Aplicaciones y Productos) es un sistema de gestión de recursos empresariales que integran muchas o todas las funciones de la empresa como finanzas, planificación, costos, comercial, mercadeo, manufactura, logística, mantenimiento, control de calidad y Recursos Humanos.



- Cada vez que se realicen ingresos y salidas de semillas de bodega, se deberá actualizar en el sitio de *SharePoint* correspondiente indicando las cantidades que se retiran, destino y la persona que retira.
- La identificación de las semillas deberá tener como mínimo los siguientes datos, dependiendo del tipo de semilla genéticamente modificada o convencional (**Figura 134**).
- El anterior rótulo deberá colocarse a cada uno de los materiales de semillas existentes en la bodega, con la suficiente protección a fin de que se preserven estos datos durante el tiempo necesario en bodega.

Figura 134. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.

 <p>Science For A Better Life</p> <p>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</p> <p>SEMILLA GENÉTICAMENTE MODIFICADA</p> <p>SEMILLA DE [Cultivo (<i>Nombre científico</i>)] VARIEDAD/ CÓDIGO:</p> <p>Tecnología: <u>XXXXXXXXXX</u> País de origen: <u>XXXXXXXXXX</u> Evento: <u>XXXXXXXXXX</u> Identificador OCDE: <u>XXXXXXXXXX</u> Contenido neto (kg):</p> <p>No. de lote:</p> <p>Fecha de ingreso a bodega:</p> <p>ADVERTENCIA: ESTA SEMILLA HA SIDO TRATADA CON PLAGUICIDAS, por lo tanto:</p> <p>"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"</p> <p>PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE BIOSEGURIDAD</p> <p>"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" "Esta semilla no está destinada para consumo"</p> <p>"En caso de liberación accidental, repórtelo a: libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx" C.P. 04100, Tel. +52 (55) 50903000 Ext. 51533</p> <p>Centro de Atención Telefónica. 018002293772 LADA sin costo.</p> 	 <p>Science For A Better Life</p> <p>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</p> <p>SEMILLA CONVENCIONAL</p> <p>SEMILLA DE [Cultivo (<i>Nombre científico</i>)] VARIEDAD/ CÓDIGO:</p> <p>Tecnología: NA País de origen: <u>XXXXXXXXXX</u> Evento: NA Identificador OCDE: NA Contenido neto (kg):</p> <p>No. de lote:</p> <p>Fecha de ingreso a bodega:</p> <p>ADVERTENCIA: ESTA SEMILLA HA SIDO TRATADA CON PLAGUICIDAS, por lo tanto:</p> <p>"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"</p> 
--	---

2. Movilización de la semilla.

La semilla saldrá del almacén sólo cuando Bayer lo autorice y será transportada vía terrestre al sitio de liberación, siguiendo las recomendaciones del documento **RG-ARC-012 Registro de transporte de semillas reguladas**.



Una vez que la semilla sea entregada al investigador responsable con quien Bayer tenga un convenio de colaboración vigente, se procederá a revisar el inventario de semilla y firmar de recibido si las cantidades despachadas coinciden con las cantidades entregadas.

En caso de liberación accidental de material de algodón genéticamente modificado durante el transporte, se notificará al correo libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx, dentro de las 24 horas siguientes que se tenga conocimiento de la misma, e informará de manera oficial en un periodo de 3 días hábiles a la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP) y a la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) de la situación, así mismo, Bayer de México implementará inmediatamente las siguientes acciones:

- Georreferenciar el sitio de la liberación accidental y delimitar el área de dispersión.
- Recuperar toda la semilla que sea posible.
- Realizar un balance entre la semilla transportada y la semilla recuperada para conocer la cantidad de semilla no recuperada y documentarlo.
- Recabar evidencia fotográfica del sitio de liberación y del material liberado.
- Establecer un programa de monitoreo de plantas voluntarias en el sitios de liberación.
- Eliminación de plantas voluntarias de manera manual o mediante el uso de herbicidas.
- Entregar un reporte al SENASICA con la documentación de las actividades realizadas.

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™ Plus (GLTC) siguiendo el objetivo plantado de comparar la equivalencia fenotípica del algodón GLTC con su contraparte convencional, así como documentar los beneficios, el impacto y uso seguro de la tecnología del cultivo de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus en la región agrícola de los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango así como el Sur del estado de Tamaulipas.

El protocolo detallado que se propone para la liberación en etapa experimental dentro de las zonas agrícolas de los Estados de Chihuahua, Coahuila y Durango así como el Sur del estado de Tamaulipas durante el ciclo agrícola PV-2016 es considerado Todos estos formqrtos son considerados como **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**.

REFERENCIAS.

- Abdelkefi-Mesrati, L., Rouis, S., Sellami, S., & Jaoua, S. (2009). Prays oleae midgut putative receptor of Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3LB differs from that of Cry1Ac toxin. *Mol. Biotechnol.*, 43, 15–19.
- Ali, M., & Luttrell, R. (2011). Susceptibility of Helicoverpa zea and Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3A insecticidal protein expressed in VipCot™ cotton. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(2), 76-84.
- Alibhai, M., & Stallings, W. (2001). Closing down on glyphosate inhibition—with a new structure for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98(6), 2944-2946.



- An, A., McDowell, J., Huang, S., McKinney, E., Chambliss, S., & Meagher, R. (1996). Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACTS actin subclass in vegetative tissue. *The Plant Journal*, 10(1), 107-121.
- Aronson, A., & Shai, Y. (2001). Why Bacillus thuringiensis insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 1-8.
- Aronson, A., Beckman, W., & Dunn, P. (1986). Bacillus thuringiensis and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.*, 50, 1-24.
- Artim, L., Hill, K., Jiang, X., Lee, M., Mascarenhas, V., Mullins, M., . . . Zawodny, J. (2003). *Petition for the determination of non-regulated status: lepidopteran insect protected VIP3A cotton transformation event COT102*. Research Triangle Park, N.C.: Syngenta Seeds, Inc.
- Baker, H. (1965). Characteristics and modes of origin of weeds. En H. Baker, & G. Stebbins, *The Genetics of Colonizing Species* (págs. 147-172). New York: Academic Press.
- Bartlett, S., Grossman, A., Chua, N., Edelman, M., Hallick, R., & Chua, N. (1982). Methods in chloroplast molecular biology. *Elsevier*.
- Bentley, R. (1990). The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 25(5), 307-384.
- Benveniste, R., & Davies, J. (1973). Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 42, 471-506.
- Betz, F., Hammond, B., & Fuchs, R. (2000). Safety and advantages of Bacillus thuringiensis: protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 156-173.
- Bevan, M., Barnes, W., & Chilton, M. (1983). Structure and transposition of the nopaline synthasa gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research*, 11, 369-385.
- Boevink, P., Chu, P., & Keese, P. (1995). Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: Affinities with the geminiviruses. *Virology*, 207, 254-361.
- Bogosian, G., & Kane, J. (1991). Fate of recombinant Escherichia coli K-12 strains in the environment. En S. Neidleman, & A. (. Laskin, *Advances in Applied Microbiology* (págs. 87-131). San Diego: Academic Press.
- Bolivar, F., Rodrigues, R., Greene, P., Betlach, M., Haymeker, H., Boyer, H., . . . Talkow, S. (1977). Construction and Characterization of New Cloning Vehicles. II. A Multipurpose Cloning System. *Gene*, 2, 95-113.
- Boocock, M., & Coggins, J. (1983). Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Letters*, 154(1), 127-133.
- Bourges, R. (2002). *Alimentos obsequio de México al mundo. La alimentación de los mexicanos*. México, D.F.: El Colegio Nacional.
- Bravo, A., Gill, S., & Soberon, M. (2007). Bravo A., Gill S. S. and Soberon M. (2007). Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S., & Peferoen, M. (1992). Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of Bacillus thuringiensis Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 247-254.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S., & Soberón, M. (2011). Bacillus thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*, 41, 423-431.
- Brubaker, C., & Wendel, J. (1994). Reevaluating the origin of domesticated cotton (Gossypium hirsutum: Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Amer. J. Bot.*, 81, 1309-1326.
- Brubaker, C., Koontz, J., & Wendel, J. (1993). Bidirectional cytoplasmic and nuclear introgression in the New World cottons, Gossypium barbadense and G. hirsutum (Malvaceae). *Amer. J. Bot.*, 80, 1203-1208.
-



- Brubaker, C., Paterson, A., & Wendel, J. (1999). Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *Genome*, 42, 184-203.
- Bulla, L., Kramer, K., & Davidson, L. (1977). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol*, 130, 375-383.
- Carpenter, J., Felsot, A., Goode, T., Hammig, M., Onstad, D., & Sankula, S. (2002). *Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops*. Ames, IA: Council for Agricultural Science and Technology.
- Chabouté, N., & Clement, B. (1987). Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H3 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 8, 179-191.
- Chapman, K. (2015). *Agronomic Assessment of GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 Cotton – Grown in the USA during 2013*. Morrisville, NC, USA: Bayer CropScience LP.
- Chapman, K., Wu, A., & Gao, Y. (2014). *Chapman, K.B.; Wu, A.J.; Gao, Y. 2014. GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 Cotton- Production and Protein Expression Analyses of Field Samples Grown in the USA during 2013*. Morrisville, N.C.: Bayer CropScience LP.
- Chapman, K., Wu, A., & Gao, Y. (2014). *GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 Cotton- Production and Protein Expression Analyses of Field Samples Grown in the USA during 2013*. Morrisville, N.C.: Bayer CropScience LP. M-500406-01-1.
- 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.
- Chilton, M., Drummond, M., Merlo, D., Sciaky, D., Montoya, A., Gordon, M., & Nester, E. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11, 263-271.
- Chroma, C., & Kaplan, H. (1990). Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: Evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. *Biochemistry*, 29, 10971-10977.
- Cornelissen, M., & Vandewiele, M. (1989). Nuclear transcriptional activity of the tobacco plasmid psbA promoter. *Nucleic Acids Research.*, 17(1), 19-29.
- Cousins, Y., Lyon, B., & Llewellyn, D. (1991). Transformation of an Australian cotton cultivar: prospects for cotton improvement through genetic engineering. *Aust. J. Plant Physiol.*, 18, 481-494.
- Currier, T. (2006). *Analyses of Raw Agricultural Commodity (Fuzzy Seed) of Cotton GHB614 for 2mEPSPS Protein, USA, 2005*. Research Triangle Park, NC, USA: Bayer CropScience.
- De Almeida, E., Gosselé, V., Muller, C., Dockx, J., Reynaerts, A., Botterman, J., . . . Timko, M. (1989). Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis* rbcS promoter: sequence encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Molecular and General Genetics*, 218, 78-86.
- De Beuckeleer, M. (2003). *Description of the amino acid sequence of the double mutant maize 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2m EPSPS)*. Bayer CropScience Internal report. 5 pages. M-234186-01-1.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti pINucleic Acid Research*, 13, 4777-4788.
- Deblaere, R., Reynaerts, A., Hofte, H., Hernalsteens, J., Leemans, J., & van Montagu, M. (1987). Vectors for cloning in plant cells. *Methods in Enzymology*, 153, 277-292.



- Delaney, B., Astwood, J., Cunny, H., Conn, R., Herouet-Guichenev, C., MacIntosh, S., . . . Levine, M. (2008). Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and Chemical Toxicology*, 46, S71–S97.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S., Taylor, M., Rochester, D., Klein, B., Shah, D., . . . Kishore, G. (1987). Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. *Bio/Technology*, 5, 579-584.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., & Goodman, H. (1982). Nopaline Synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1, 561-573.
- Ebersold, H., Geiser, P., & Ettliger, L. (1978). The action of the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. *Experientia*, 34, 1672.
- English, L., & Slatin, S. (1992). The mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 1-7.
- ERS-USDA. (2010). *Field Crops. Usual Planting and Harvesting Dates. Agricultural Handbook Number 628*. Washington, DC: United States Department of Agriculture-National Agricultural Statistics Service (USDA-NASS).
- Eschenburg, S., Healy, M., Priestman, M., Lushington, G., & Schonbrunn, E. (2002). How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta*, 216, 129–135.
- Estruch, J., Warren, G., Mullins, M., Nye, G., Craig, J., & Koziel, M. (s.f.). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidoperan insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5389-5394.
- Fawcett, R., & Towery, D. (2004). *Conservation Tillage and Plant Biotechnology: How New Technologies Can Improve the Environment By Reducing the Need to Plow*. West Lafayette, IN: Conservation Technology Information Center (CTIC).
- Forlani, G., Parisi, B., & Nielsen, E. (1994). 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from *Zea mays* cultured cells. *Plant Physiol.*, 105, 1107-1114.
- Frankenhuyzen, V., & Nystrom, C. (2002). *The Bacillus thuringiensis toxin specificity database*. Obtenido de <http://www.glf.c.forestry.ca/bacillus/BtSearch.cfm>
- Franz, J., Mao, M., & Sikorski, J. (1997). *Glyphosate: A Unique Global Herbicide ACS Monograph 189* (1st Edition ed.). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Fryxell, P. (1979). The origin and spread of the tribe. En *The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae)* (págs. 131-218). College Station, TX: Texas A&M University Press.
- Fryxell, P. (1984). Taxonomy and Germplasm Resources. En R. Kohel, C. Lewis, R. Kohel, & C. F. Lewis (Edits.), *Cotton* (págs. 27-57). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- Fryxell, P. (1992). A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedea*, 2, 108–165.
- Gallardo, J., Rosales, R., & Reyes, R. (2015). *Guía para cultivar algodón en el norte de Tamaulipas*. Campo Experimental Río Bravo, CIR - Noreste - INIFAP.
- García Urigüen, P. (2012). *La alimentación de los mexicanos. Cambios sociales y económicos, y su impacto en los hábitos alimenticios*. Mexico, D.F.: CANACINTRA.
- Gringorten, J., Milne, R., Fast, P., Sohi, S., & Frankenhuyzen, V. (1992). Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y K. Van Frankenhuyzen. 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 47-52.



- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Puzstai-Carey, M., Schwartz, J., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). Bacillus thuringiensis CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.*, 254, 447-464.
- Gupta, B., Dow, J., Hall, T., & Harvey, W. (1985). Electron probe X-ray microanalysis of the effects of Bacillus thuringiensis var. kurstaki crystal protein insecticide on ions and electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, Manduca sexta in vitro. *J. Cell Sci.*, 174, 137-152.
- Habex, V. (2006). *Structural stability analysis of Gossypium hirsutum transformation event GHB614*. Gent, Belgium: Bayer BioScience N.V.
- Haelterman, S. (2009). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event T304-40. Protocol PGS0491*. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Hake, K., Kerby, T., Hake, S., Bentley, W., Goodell, P., & Vargas, R. (1996). Cotton crop problems. En S. Hake, T. Kerby, & K. Hake, *Cotton production manual*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources.
- Hamilton, K., Goodman, R., & Fuchs, R. (2002). Safety assessment of insect-protected cotton. En J. Thomas, & R. Fuchs, *Biotechnology and safety assessment* (Third ed.). St. Louis, MO: Academic Press-Elsevier Science.
- Harpster, M., Townsend, J., Jones, J., Bedbrook, J., & Dunsmuir, P. (1988). Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus 1', 2' and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Molecular and General Genetics*, 212, 182-190.
- Health-Canada. (2013). *Health Canada's Position on Highly Refined Oils Derived from Food Allergen Sources*. Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch.
- Hérouet, C., Esdaile, D., Mallyon, B., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., . . . 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*, 134-149.
- Herouet-Guicheney, C., Rouquié, D., Freyssinet, M., Currier, T., Martone, A., Zhou, J., . . . Rouan, D. (2009). Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54, 143-153.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., & Van Mellaert, H. (1988). Specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7844-7848.
- Hofte, H., & Whiteley, H. (1989). Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-255.
- Hooykaas, P., & Schilperoor, R. (1992). Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19, 15-38.
- Hutchinson, J. (1959). *The application of genetics to cotton improvement*. London: Cambridge Univ. Press.
- ILSI. (2011). *Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ab*. Washington D.C. USA.: Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation.
- ILSI. (2012). *Revisión de la seguridad ambiental de Vip3Aa*. Washington, D.C., USA: Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation.
- Itoh, Y., Watson, J., D., H., & Leisinger, T. (1984). Genetic and molecular characterization of the Pseudomonas plasmid pVS1. *Plasmid*, 11, 206.



- Jiang, C., Wright, R., Woo, S., DelMonte, T., & Peterson, A. (2000). QTL analysis of leaf morphology in tetraploid *Gossypium* (cotton). *Theor. Appl. Genet.*, 100, 409-418.
- Kanobe, C. (2014). *Comparative evaluation of the germination potential of GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 and FM966 cotton*. Research Triangle Park, NC: Bayer CropScience LP.
- Kantartzi, S. (2010). Hybridization barriers between cotton (*Gossypium hirsutum*) and species of the Malvaceae family. En B. Kaiser, *Pollen: structure, types and effects* (págs. 305-315). New York: Nova Science Publishers.
- Kareiva, P., Morris, W., & C., J. (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and their wild relatives. *Molec. Ecology*, 3, 15-21.
- Kaster, K., Burgett, S., Rao, R., & Ingolia, T. (1983). Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nuc. Acids Res.*, 11(19), 6895-6911.
- Kishore, G., & Shah, D. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 627-663.
- Knowles, B., & Dow, J. (1993). The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioessays*, 15, 469-476.
- Knowles, B., Blatt, M., Tester, M., Horsnell, J., Carroll, J., Menestrina, G., & Ellar, D. (1989). A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett*, 244, 259-262.
- Koch, M., Ward, J., Levine, S., Baum, J., Vicini, J., & Hammond, B. (2015). The food and environmental safety of Bt crops. *Front Plant Sci.*, 29(6), 283.
- Kohel, R., Lewis, C., & Richmond, T. (1965). The genetics of flowering response in cotton. V. Fruiting behavior of *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* in interspecific hybrids. *Genetics*, 51, 601-604.
- Kumar, P., Sharma, R., & Malik, V. (1996). Kumar P. A., Sharma R. P. and Malik V.S. (1996). The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Applied Microbiology*, 42, 1-43.
- Lebrun, M., Leroux, B., & Sailland, A. (1996). *Chimeric gene for the transformation of plants*. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996). RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR).
- Lebrun, M., Sailland, A., & Freyssinet, G. (1997). *Mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene encoding for said protein and transformed plants containing said gene*. International patent publication W0 97/04103-A2. 06.02.97. 25 pages.
- 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).
- Lee, M., Walters, F., Hart, H., Palekar, N., & Chen, J. (2003). The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab δ -Endotoxin. *Appl Environ Microbiol.*, 69(8), 4648-4657.
- Leemans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu, M., & Schell, J. (1982). Broad-host-range cloning vectors derived from the W₂ plasmid Sa. *Gene*, 19, 361-364.
- Lemeshev, N. (1978). Algodón. En T. Cervantes, *Recursos Genéticos Disponibles a México* (págs. 385-387). Chapingo, México: Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.
- López-Fuentes, M. (1994). *Los caminos de la fitobacteriología*. Chapingo, México: Univeridad Autónoma Chapingo.
- Machain Lillingston, M., Díaz Talamante, F., & Guzmán Ruiz, S. (1988). *Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali. Campo Agrícola Experimental Valle de Mexicali*. INIFAP. Mexicali, B.C.: Campo Agrícola Experimental Valle de Mexicali. INIFAP.
- Machain-Lillingston, M., Medina-Martínez, R., Méndez-Páramo, P., Reyes-Catalan, R., De la Cerda López, R., & Legaspi-Díaz. (1995). *Manejo del algodónero para escape al daño de*



- mosquita blanca de la hoja plateada*. Mexicali, B.C.: Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California.
- Marshall, J., Stubbs, J., & Taylor, W. (1996). Two genes encode highly similar chloroplastic NADP-malic enzymes in *Flaveria*. *Plant Physiology*, 111, 1251-1261.
- McClintock, J., Schaffer, C., & Sjoblad, R. (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.*, 45, 95–105.
- McGregor, S. (1976). *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. Agriculture Handbook No. 496*. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
- Mertens, K., & Moens, S. (2008). *Structural stability analysis of Gossypium hirsutum transformation event T304-40 over different generations, in different backgrounds and grown in different environments*. Gent, Belgium: Bayer BioScience N.V.
- Meyer, V. (1973). Fertility restorer genes for cytoplasmic male sterility from *Gossypium harknessii*. *Proceedings Beltwide Cotton* (pág. 65). Phoenix, Arizona: Prod. Res. Conf.
- Michiels, F., Morioka, S., Scheirlinck, T., & Komari, T. (1992). *Stamen-specific promoters from rice. Patent Application WO92/13956A1 (20AUG-1992)*. PLANT GENETIC SYSTEMS N.V. (BE).
- Milton Poehlman, J., & Sleper, D. A. (1995). *Breeding field crops Fourth Edition*. Iowa State University Press/Ames.
- Morishita, D. (2012). *What makes a weed a weed*. Weed Science Society of America (WSSA). www.wssa.net.
- Murray, E., Lotzer, J., & Eberle, M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucl. Acid Res.*, 17, 477-498.
- Murray, F., Llewellyn, D., MacFadden, H., Last, D., Dennis, E., & Peacock, W. (1999). Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. *Molecular Breeding*, 5, 219-232.
- Niles, G., & Feaster, C. (1984). Breeding. En R. Kohel, & C. Lewis, *Cotton Agronomy* (Vol. 24, págs. 201-223). Madison, WI: American Society of Agronomy.
- Norris, S., Meyer, S., & Callis, J. (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*, 21(5), 895-906.
- Odell, J., Nagy, F., & N.H., C. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810-812.
- OECD. (1999). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11*. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. (2002a). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 25. *Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. ENV/JM/MONO(2002)14*. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. (2007). *Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing Bacillus thuringiensis - Derived Insect Control Protein. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 42*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. (2008). *Consensus document on the biology of cotton (Gossypium spp.). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 45*. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Ogiwara, K., Indrasith, L., Asano, S., & Hori, H. (1992). Processing of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 121-126.
-



- Oka, A., Sugisaki, H., & Takanami, M. (1981). Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *Journal of Molecular Biology*, 147, 217-226.
- Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Ueda, M., Ozeki, Y., & Hirose, M. (2008). Evaluation of subchronic toxicity of dietary administered Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* var. Kurustaki HD-1 in F344 male rats with chemically induced gastrointestinal impairment. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2184–2189.
- Pacheco-Mendivil, F. (1994). *Plagas de los cultivos oleaginosos en México*. Cd. Obregón, Son. México.: INIFAP - Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO).
- Palomo, A. (1996). Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 4, 359-369.
- Peeters, K. (2014). *Structural stability analysis of Gossypium hirsutum GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102. Study Number BBS13-031*. Gent, Belgium: Bayer CropScience N.V.
- Percival, A., Wendel, J., & Stewart, J. (1999). Cotton: origin, history, technology, and production. En W. Smith, *Cotton: origin, history, technology, and production* (págs. 33–63). Wiley, New York.
- Percy, R., & Wendel, J. (1990). Allozyme evidence for the origin and diversification of *Gossypium barbadense*. *Theor. Appl. Genet.*, 79, 529-542.
- Percy, R., Calhoun, M., & Kim, H. (1996). Seed gossypol variation within *Gossypium barbadense* L. cotton. *Crop Science*, 36, 193–197.
- PLM. (2006). *Diccionario de especialidades agroquímicas. 16 Edición*. México, D.F.: Thomson PLM.
- Quiñones-Pando, F., Galván-Lamas, R., & Báez-Iracheta, F. (2000). *Tecnología de producción de algodón en la región centro sur del estado de Chihuahua. Centro de Investigación Regional Norte-Centro*. Delicias, Chih. México.: INIFAP-SAGAR.
- Rao, V. (2015). *Transgenic Herbicide Resistance in Plants*. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- Robinson, A., Bowman, D., Cook, C., Jenkins, J., Jones, J., May, O., . . . Stewart, J. (2001). Nematode Resistance. En T. Kirkpatrick, & C. Rothrock, *Compendium of cotton diseases* (Second Edition ed., págs. 68–72). St. Paul, MN: APS Press.
- Rouquie, D. (2006b). *Rouquie, D. 2006b. 2mEPSPS PROTEIN. Overall amino acid sequence homology search with known toxins and allergens. In silico Study report SA 06103*. Sophia Antipolis Cedex. France: Bayer CropScience.
- Rouquie, D. (2007). *Cry1Ab protein. Acute toxicity by oral gavage in mice*. Sophia Antipolis Cedex, France: Bayer CropScience.
- Ruiz-Corral, J., Medina-García, G., Ortiz-Trejo, C., Martínez-Parra, R., González Acuña, I., Flores-López, H., & Byerly-Murphy, K. (1999). *Requerimientos agroecológicos de cultivos*. Guadalajara, Jal., México.: Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, INIFAP, SAGAR.
- Sacchi, V., Parenti, P., Hanozet, G., Giordana, B., Luthy, P., & Wolfersberger, M. (1986). *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.*(204), 213–218.
- Salgado, S., & Silguero, J. (1997). *Guía para cultivar algodón de temporal en el Sur de Tamaulipas*. Campo Experimental Sur de Tamaulipas – INIFAP.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanfaçon, H., Brodman, P., & Hohn, T. (1991). A dissection of the Cauliflower Mosaic Virus polyadenylation signal. *Genes and Development*, 5, 141-149.
- Scott, A., Bushey, D., Freyssinet, M., Poe, M., & Rinehardt, M. (2008). *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-GHØØ*. Research Triangle Park, NC, USA: BayerCropScience LP.



- Scott, A., Bushey, D., Freyssinet, M., Poe, M., & Rinehardt, M. (2008). *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*. Research Triangle Park, NC, USA: BayerCropScience LP.
- Scott, A., Van Duyn, G., Freyssinet, M., Poe, M., & Trolinder, L. (2006). *Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol™ cotton Event GHB614 OECD Unique Identifier BCS-GHØØ2-5*. Research Triangle Park, NC, USA: Bayer CropScience LP.
- Sena, J., Hernández-Rodríguez, C. S., & Ferré, J. (2009). Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7).
- Sikorski, J., & Gruys, K. (1997). Understanding glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: Evidence favoring an allosteric inhibitor model. *Accounts of Chemical Research*, 30, 2-8.
- Sims, S., Berberich, S., Nida, D., Segalini, L., Leach, J., Eber, C., & Fuchs, R. (1995). Analysis of Expressed Proteins in Fiber Fractions from Insect-Protected and Glyphosate-Tolerant Cotton Varieties. *American Society of Agronomy*, 36(5), 1212-1216.
- Sjoblod, R., McClintock, J., & Engler, R. (1992). Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 1, 3-9.
- Skovsted, A. (1937). Cytological studies in cotton IV. Chromosome conjugation in interspecific hybrids. *J. Genet.*, 34, 95-134.
- Smith, C., Cantrell, R., Moser, H., & Oakley, S. (1999). History of Cultivar Development in the United States. En C. Smith, & J. Cothren, *Cotton: Origin, History, Technology, and Production* (págs. 99–171). New York.: John Wiley & Sons.
- Soberón, M., & Bravo, A. (2007). *Las toxinas Cry de Bacillus thuringiensis: modo de acción y consecuencias de su aplicación*. Cuernavaca, Mor.: Instituto de Biotecnología-UNAM.
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., & Eguiarte, L. (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *INCI*, 26(10), 513-517.
- Steinrücken, H., & 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.
- Stewart, J. (1995). Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. En C. Git, & N. Forrester, *Proc. World Cotton Research Conference* (págs. 313-327). Melbourne: CSIRO .
- Strickberger, & M.W. (1976). *Genetics, 2nd Ed. Chapter 8. Probability and Statistical Testing*. New York: Macmillan Publishing Co., Inc.
- Sundstrom, F. (2001). Pollen Transfer in Cottonseed Production. In *The Biotech Evolution of the Seed Industry: Adventitious Presence, Quality Assurance and Orderly Marketing*.
- Talipov, F., Salgado, U., Catalan, H., Domínguez, M., & Bahena, L. (1995). *El cultivo del algodón y su mejoramiento genético en el estado de Guerrero*. Universidad Autónoma de Guerrero: Dirección de Investigación Científica.
- Tempé, J., Petit, A., Holsters, M., Montagu, M., & Schell, J. (1977). Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(7), 2848–2849.
- Thompson, C., Movva, N., Tichard, R., Cramer, R., Davies, J., & Lauwereys, M. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.*, 6, 2519–2523.



- Tinland, B., & Hohn, B. (1995). Recombination between Prokaryotic and Eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Genetic Engineering*, 17, 209-229.
- Tojo, A., & Aizawa, K. (1983). Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 576-580.
- Totis, M. (2015). *Cry2Ae protein. Acute toxicity study by oral gavage in mice*. Sophia Antipolis Cedex, France: Bayer CropScience.
- Trolinder, N., & Goodin, J. (1988a). Somatic Embryogenesis in Cotton (*Gossypium*): I. Effects of Source of Explant and Hormone Regime. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 31-42.
- Trolinder, N., & Goodin, J. (1988b). Somatic Embryogenesis in Cotton (*Gossypium*): II. Requirements for Embryo Development and Plant Regeneration. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 43-53.
- Ulloa, M., Stewart, J., Garcia, E., Godoy, A., Gaytan, M., & Acosta, N. (2006). Cotton genetics resources in the western states of Mexico: in situ conservation status and germplasm collection for ex situ preservation. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 53 653-668.
- Umbeck, P., Barton, K., Nordheim, E., McCarty, J., Parrott, W., & Jenkins, J. (1991). Degree of Pollen Dispersal by Insects from a Field Test of Genetically Engineered Cotton. *J. Econ. Entomology*, 84, 1943-1991.
- USEPA. (2008). *Bacillus thuringiensis modified Cry1Ab (SYN-IR67B-1) and Vip3Aa19 (SYN-IR102-7) insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in COT102 X COT67B cotton*. Washington, D.C.: www.epa.gov/oppbppd1/.
- Vadlamudi, R., Weber, E., Ji, I., Ji, T., & Bulla, L. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270, 5490-5494.
- Van Den Elzen PJM, T. J. (1985). A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.*, 5, 299-302.
- Van der Klis, R., & De Pestel, K. (2006). *2mEPSPS protein contents in leaf, stem, root, square, apex and pollen tissues during the life cycle of the glyphosate tolerant cotton event GHB614*. Belgium: Bayer BioScience N.V. Belgium. M-280254-01-1.
- Van Deynze, A., Sundstrom, F., & Bradford, K. (2005). Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity. *Crop Sci.*, 45, 1565-1570.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., & Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur J Biochem*, 186, 239-247.
- Van Rie, j., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., & Van Mellaert, H. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1378-1385.
- Vanhoutte, N. (2014). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event COT102. Protocol MDP1949 + MDP1177*. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Vanhoutte, N. (2014). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event GHB119. Protocol PGS0489 + PGS0477*. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Vanhoutte, N. (2014). *Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event GHB614. Protocols PGS0486 + PGS0477*. Gent, Belgium: Crop Analytics, Bayer CropScience N.V.
- Verdaguer, B., De Kochko, A., Beachy, R., & Fauquet, C. (1996). Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*, 31, 1129-1139.



- Verdaguer, B., de Kochko, A., Fux, C., Beachy, R., & Fauquet, C. (1998). Functional organization of the cassava mosaic virus (CsVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*, 37, 1055-1067.
- Verhaeghe, S., & 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 BioScience N.V. Technologiepark 38, B-9052 Ge. Gent, Belgium: Bayer BioScience N.V.
- Waldron, C. (1997). United States Patent No. 5,668,298. Selectable marker for development of vectors and transformation systems in plants.
- Walsh, C., Benson, T., Kim, D., & Lees, W. (1996). The versatility of phosphoenolpyruvate and its vinyl ether products in biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 3, 93-91.
- Wang, G., Dong, J., & Paterson, A. (1995). The distribution of Gossypium hirsutum chromatin in G. barbadense germ plasm: molecular analysis of introgressive plant breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 1153-1161.
- Webber, J. (1934). Cytogenetic notes on cotton and cotton relatives. *Science*, 21, 268-269.
- Webber, J. (1935). Interspecific hybridization in Gossypium and the behavior of F1 plants. *J. Agric. Res.*, 51, 1047-1070.
- Webber, J. (1939). Relationships in the genus Gossypium as indicated by cytological data. *J. Agric. Res.*, 58, 237-261.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., & Schulz, A. (1996). The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*, 14, 1274-1278.
- Wendel, J. (1989). New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 86(11), 4132-4136.
- Wendel, J., & Albert, V. (1992). Phylogenetics of the cotton genus (Gossypium): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Syst. Bot.*, 17, 115-143.
- Wendel, J., Brubaker, C., & Seelanan, T. (2010). The origin and evolution of Gossypium. En J. Stewart, D. Oosterhuis, J. Heitholt, & J. Mauney, *Physiology of cotton* (págs. 1-18). New York: Springer.
- Wolfersberger, M., Hofmann, C., & Luthy, P. (1986). Interaction of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. En P. Falmagne, J. Alouf, J. Fehrenbach, J. Jeljaszewics, & M. Thelestam, *Bacterial Protein Toxins*. New York: Gustav Fischer.
- YYu, X., Zheng, A., Zhu, J., Wang, S., Wang, L., Deng, Q., . . . Li, P. (2003). Characterization of vegetative insecticidal protein vip genes of Bacillus thuringiensis from Sichuan Basin in China. *Current Microbiology*, 43(6), 287-290.
- Zambryski, P. (1988). Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. *Ann. Rev. Genet.*, 22, 1-30.
- Zeng, L., Meredith, W. C., Dever, J., Zhang, J., Glass, K., Jones, A., . . . Bourland, F. (2014). Genotype-by-Environment Interaction Effects on Lint Yield of Cotton Cultivars Across Major Regions in the U.S. Cotton Belt. *Journal of Cotton Science*, 18, 75-84.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N., Taussig, R., & Bulla, L. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis. *Proceedings of the National Academies of Science (U.S.A.)*, 103(26), 9897-9902.
- Zhou, M., Xu, H., Wei, X., Ye, Z., Wei, L., Gong, W., . . . Zhu, Z. (2006). Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. *Plant Physiology*, 140, 184-195.