



Bayer CropScience

**SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE DE
ALGODÓN GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25); OECD: BCS-
GHØØ2-5 x ACS GHØØ1-3 EN ETAPA EXPERIMENTAL, EN LA
REGION AGRÍCOLA DE TAMAULIPAS NORTE, CICLO PV-2017.**

Compañía:

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

México, D.F., a 27 de julio de 2016.

Este documento contiene información confidencial y está destinado para uso exclusivo de la autoridad regulatoria a la que se somete por Bayer y solo puede ser usado para respaldar las acciones solicitadas por Bayer. Al presentar estos documentos y materiales, Bayer 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.



LISTA DE CUADROS	9
LISTA DE FIGURAS	12
ANEXOS	Error! Bookmark not defined.
1. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DE QUIEN PROMUEVE	16
2. NOMBRE DE LOS RESPONSABLES DEL SEGUIMIENTO A LAS PRUEBAS DE CAMPO (Se autoriza de acuerdo al artículo 5 del reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados para recibir notificación vía electrónica)	Error! Bookmark not defined.
3. Otras personas involucradas en las pruebas de campo y que tengan capacidad de decisión sobre éstas.	Error! Bookmark not defined.
4. Personas que desarrollaron el producto y que pueden ampliar la información Error! Bookmark not defin	
5. Currículum Vitae de los involucrados en la liberación del OGM. Error! Bookmark not defined.	
I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM	17
I.a. Identificador único del evento de transformación	17
I.b. Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México	17
I.c. Existencia de especies sexualmente compatibles	21
I.d. Hábitats de persistencia o proliferación	22
I.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 LLCotton25.....	25
3. Identificación de los organismos donadores para los eventos GHB614, LLCotton25.	26
3.1. Maíz (<i>Zea mays</i>).	26
3.2. <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	26
3.3. Historial de uso seguro de los organismos donantes.	27
4. Identificación de los organismos donadores de secuencias reguladoras.....	27
4.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
4.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
4.3. <i>Zea mays</i>	29
4.4. Virus del mosaico de la coliflor (CaMV).....	30
I.f. País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido	31
I.g. Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor	31
1. Origen y diversificación del algodón.....	31
2. Especies silvestres y distribución.	32
I.h. Secuencia génica detallada del evento de transformación (tamaño del fragmento, sitio de inserción y oligonucleótidos)	36
1. Doble apilado GL (GHB614 x LLCotton25).	36
2. Evento GHB614.....	42
3. Evento LLCotton25.	43
I.i. Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros con demostración de resultados	44
1. Secuencias flanqueantes.	44
1.1. Doble apilado (GHB614 x LLCotton25).	44
1.2. Evento GHB614.	45
1.3. Evento LLCotton25.	45
2. Número de copias.....	46
2.1. Doble apilado (GHB614 x LLCotton25).	46
2.2. Evento GHB614.	47



2.2. Evento LLCotton25.	49
3. Expresión de RNA mensajero (mRNA).	51
I.j. Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres, expresión de las proteínas y su localización	55
1. Mapas de las construcciones genéticas.	55
1.1. Evento GHB614.	55
1.2. Evento LLCotton25.	56
2. Tipo de herencia de los caracteres.	58
2.1. Evento GHB614.	58
2.2. Evento LLCotton25.	61
2.3. Algodón GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25).	64
3. Expresión de proteínas y su localización.	64
I.k. Descripción del método de transformación	67
1. Evento GHB614.	67
2. Evento LLCotton25.	68
3. Algodón GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25).	69
I.l. Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de los efectos no esperados	70
1.1. Doble apilado (GHB614 x LLCotton25).	70
2. Evento GHB614.	71
2.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.	71
2.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.	71
2.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.	71
2.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.	71
2.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.	73
3. Evento LLCotton25.	75
3.1. Verificación del inserto y número de copias de la secuencia insertada.	75
3.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.	75
2.3. Presencia de genes marcadores y origen de replicación del vector.	75
2.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.	75
I.m. Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples	77
1. Proteína 2mEPSPS.	77
2. Proteína PAT.	78
I.n. Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios	78
1. Proteína 2mEPSPS.	78
2. Proteína PAT/ <i>bar</i>	80
I.o. Productos de degradación de la proteína codificada por el transgén en subproductos	82
1. Proteína 2mEPSPS.	82
2. Proteína PAT/ <i>bar</i>	84
I.p. Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras (promotores, terminadores y otras), descripción, número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora	86
I.q. Patogenicidad o virulencia de los organismos receptores y donadores	87
1. Organismo receptor – algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>).	87
1.1. Usos del algodón.	87



1.2. Semilla de algodón para alimentación animal.....	88
1.3. Productos derivados de semilla de algodón.....	88
1.3.1. Aceite de semilla de algodón.....	88
1.3.2. Torta de semilla de algodón como alimento animal.....	89
1.3.3. <i>Linter</i> de semilla de algodón.....	90
1.3.4. Semilla de algodón deslintada.....	90
2. Organismos donadores para los eventos GHB614 y LLCotton25.....	91
2.1. Maíz (<i>Zea mays</i>).....	91
2.2. <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	92
3. Organismos donadores de los elementos reguladores.....	92
3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	92
3.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	93
3.3. <i>Zea mays</i>	94
3.4. Virus del mosaico de la coliflor (CaMV).....	95
I.r. Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotipo que confiere estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de estos genes.....	95
1. Gen <i>2mepsps</i>	96
2. Gen <i>bar</i>	96
I.s. Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgén.....	99
1. Evento GHB614.....	99
2. Evento LLCotton25.....	100
3. Evento doble apilado GHB614 x LLCotton25.....	101
I.t. Referencia bibliográfica sobre los datos presentados.....	102
II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA O ZONAS DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM....	108
II.a. Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.....	108
II.b. Ubicación del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.....	109
II.c. Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según características de diseminación del OGM.....	110
II.c.1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos.....	110
II.c.1. Descripción geográfica.....	116
II.c.2. Plano de ubicación señalando vías de comunicación.....	117
2.1. Áreas Naturales Protegidas.....	117
2.2. Sitios Ramsar.....	118
2.1.3. Regiones ecológicas nivel IV.....	120
2.1.4. Plano de ubicación señalando vías de comunicación.....	121
III. ESTUDIOS DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA.....	122
III.a. Estabilidad de la modificación genética del OGM.....	122
1. Evento GHB614.....	122
2. Evento LLCotton25.....	123
3. Evento doble apilado GHB614 x LLCotton25.....	124
4. Conclusión.....	125
III.b. Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína en diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren.....	126
III.c. Características del fenotipo del OGM.....	129



III.d. Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el medio ambiente receptor del OGM.....	129
III.e. Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica.....	130
III.f. Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM.....	133
1. Algodón GlyTol® LibertyLink®.....	133
2. Inocuidad de la proteína 2mEPSPS.....	134
3. Inocuidad de la proteína PAT/ <i>bar</i>	134
4. Potencial como maleza.....	135
III.g. Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad.....	136
III.h. Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas.....	136
1. Mecanismos de cruzamiento con especies del genero <i>Gossypium</i>	136
2. Mecanismos necesarios para el intercambio genético.....	137
3. Vigor de híbridos interespecíficos y fertilidad.....	138
4. Potencial de cruce y transferencia de genes.....	141
III.i. Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.....	143
IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD A LLEVAR A CABO.....	146
IV.a. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad.....	146
IV.a.1. Plan de monitoreo detallado.....	146
1.1. Obtención del Permiso de Liberación al Ambiente (PLA).....	146
1.2. Análisis de medidas de bioseguridad y condicionantes.....	146
1.3. Convenio de investigación.....	147
1.4. Importación y almacenaje de la semilla.....	147
1.5. Movilización de la semilla.....	149
1.6. Capacitación en el cumplimiento de medidas de bioseguridad y <i>stewardship</i>	150
IV.a.2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM.....	151
2.1. Siembra del ensayo.....	151
2.2. Limpieza de maquinaria.....	162
2.3. Evaluación de la tecnología.....	162
2.4. Acceso al ensayo.....	163
2.5. Auditorías internas de cumplimiento.....	163
2.6. Auditorías internas de <i>Stewardship</i>	163
2.8. Destrucción del ensayo.....	163
2.9. Monitoreo de plantas voluntarias.....	163
IV.a.3. Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona de la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación.....	164
IV.b. Medidas y procedimientos de bioseguridad.....	164
IV.b.1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación.....	164
IV.b.2. Medidas y procedimientos para disminuir el acceso de organismos vectores de dispersión, o de personas que no se encuentren autorizadas para ingresar al área de liberación a dicha zona o zonas.....	167
IV.b.3. Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas ...	168
IV.b.4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar el OGM ...	168



IV.b.5. Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado	169
5.1. Medidas de control para prevenir un evento de liberación no intencional.....	169
5.2. Autorizaciones regulatorias de los eventos GHB614 y LLCotton25.....	169
5.3. Seguridad de la proteína 2mEPSPS.	170
5.5. Seguridad de la proteína PAT/ <i>bar</i>	171
IV.b.6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación	171
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 PROVOMENTE.	171
V.a. Descripción de la zona en donde se realizó la liberación	171
V.b. Efectos de la liberación sobre la flora y fauna	174
1. Tecnología GlyTol® (GHB614).	174
2. Tecnología LibertyLink® (LLCotton25).....	175
V.c. Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen (descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad)	176
V.d. En caso de que el promovente lo considere adecuado. Otros estudios o consideraciones en los que se analicen tanto la contribución del OGM a la solución de problemas ambientales, sociales, productivos o de otra índole	178
V.e. En caso de importación, copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen	181
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	183
a) Malezas en el cultivo del algodón.	183
b). Algodón genéticamente modificado tolerante a herbicidas.	184
1. Algodón tolerante a glifosato.	184
2. Algodón tolerante a glufosinato de amonio.	184
3. Resistencia de maleza a herbicidas.	189
4. Alternativas al uso de algodón tolerante a herbicidas.....	191
c). Plagas del cultivo de algodón.	197
1. Complejo bellotero (<i>Helicoverpa zea</i>)/ tabacalero (<i>Heliothis virescens</i>).	197
2. Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>).	198
3. Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>).	198
4. Gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>).	199
5. Mosquita blanca (<i>Bemisia argentifolii</i>).	200
6. Picudo del algodón (<i>Anthonomus grandis</i> Boheman).	200
7. Conchuela del algodón (<i>Chlorochroa ligata</i> Say).	201
8. Chinche Lygus (<i>Lygus</i> spp.).....	202
9. <i>Thrips</i>	202
10. Pulgón del algodón (<i>Aphis gossypii</i>).	203
d) Control químico de insectos.....	203
g) Literatura consultada.	205
VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O BIORREMEDIACIÓN	208



***En caso de no contar con dicha autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente, anexa a un escrito libre en el que se indiquen el Número de autorización y el número de folio. 208**

VIII. LA PROPUESTA DE LA VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA..... 208

INFORMACIÓN ADICIONAL..... 208

A. La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte. 208

1. Importación y almacenamiento de la semilla. 209

2. Movilización de la semilla. 211

B. El diseño experimental que se llevarán a cabo durante la liberación en etapa experimental. 211

C. Beneficio económico y ambiental de los cultivos biotecnológicos. 212

1. Adopción de cultivos biotecnológicos. 212

2. Beneficio económico y ambiental. 214

ESTUDIO Y EVALUACIÓN DEL RIESGO. Error! Bookmark not defined.

ARTÍCULOS 42, FRACCIÓN III, Y 62 DE LA LEY DE BIOSEGURIDAD DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS. Error! Bookmark not defined.

IDENTIFICACIÓN DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA. Error! Bookmark not defined.

I. La identificación de características nuevas asociadas con el OGM que pudieran tener posibles riesgos en la diversidad biológica. Error! Bookmark not defined.

a) Características nuevas asociadas con el OGM. **Error! Bookmark not defined.**

1. Algodón GHB614 x LLCotton25. **Error! Bookmark not defined.**

2. Proteína 2mEPS. **Error! Bookmark not defined.**

3. Proteína PAT/*bar*. **Error! Bookmark not defined.**

II. La evaluación de que estos posibles riesgos ocurran realmente, teniendo en cuenta el nivel y el tipo de exposición del OGM. Error! Bookmark not defined.

a) Identificación de posibles riesgos. **Error! Bookmark not defined.**

b) Potencial de flujo génico. **Error! Bookmark not defined.**

1. Flujo génico mediado por polen. **Error! Bookmark not defined.**

2. Potencial de cruzamiento con especies silvestres. **Error! Bookmark not defined.**

2.1 Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas. **Error! Bookmark not defined.**

2.2. Mecanismos de cruzamiento con especies del género *Gossypium*. **Error! Bookmark not defined.**

2.3. Mecanismos necesarios para el intercambio genético. **Error! Bookmark not defined.**

2.4. Vigor de híbridos interespecíficos y fertilidad. **Error! Bookmark not defined.**

2.5. Conclusión. **Error! Bookmark not defined.**

c) Potencial del OGM para convertirse en maleza. **Error! Bookmark not defined.**

d) Potencial de selección de especies de maleza resistentes a herbicidas. **Error! Bookmark not defined.**

1. Resistencia de malezas a herbicidas. **Error! Bookmark not defined.**

2. Plan de manejo para prevenir el desarrollo de resistencia de malezas a herbicidas. **Error! Bookmark not defined.**

2.1. Evaluación del riesgo de desarrollo de resistencia. **Error! Bookmark not defined.**

2.2. Mitigación del riesgo. **Error! Bookmark not defined.**

2.3. Recomendaciones en caso de control deficiente y confirmación de resistencia. **Error! Bookmark not defined.**

2.4. Monitoreo de la resistencia y programa de evaluación. **Error! Bookmark not defined.**

2.4.1. Seguimiento a las recomendaciones de dosis de uso de producto. **Error! Bookmark not defined.**

2.4.2. Aplicación de la dosis correcta en el momento correcto. **Error! Bookmark not defined.**

2.4.3. Soporte y respuesta a inquietudes por control deficiente. **Error! Bookmark not defined.**

2.5. Programas de entrenamiento y educación. **Error! Bookmark not defined.**



- g) Estabilidad..... **Error! Bookmark not defined.**
- III. La evaluación de las consecuencias si posibles riesgos ocurrieran realmente.** **Error! Bookmark not defined.**
- IV. La estimación del posible riesgo global que represente el OGM, basada en la evaluación de la probabilidad de que los posibles riesgos y las consecuencias identificadas ocurran realmente.**..... **Error! Bookmark not defined.**
- V. La recomendación sobre si los posibles riesgos son aceptables o manejables, o no lo son, incluyendo la determinación de estrategias para el manejo de esos posibles riesgos.** **Error! Bookmark not defined.**
- a) Plan de manejo para prevenir el desarrollo de resistencia de malezas a herbicidas. **Error! Bookmark not defined.**
 - 1. Evaluación del riesgo de desarrollo de resistencia. **Error! Bookmark not defined.**
 - 2. Mitigación del riesgo. **Error! Bookmark not defined.**
 - 3. Recomendaciones en caso de control deficiente y confirmación de resistencia. **Error! Bookmark not defined.**
 - 4. Monitoreo de la resistencia y programa de evaluación. **Error! Bookmark not defined.**
 - 4.1. Seguimiento a las recomendaciones de dosis de uso de producto. **Error! Bookmark not defined.**
 - 4.2. Aplicación de la dosis correcta en el momento correcto. **Error! Bookmark not defined.**
 - 4.3. Soporte y respuesta a inquietudes por control deficiente. .. **Error! Bookmark not defined.**
 - 5. Programas de entrenamiento y educación. **Error! Bookmark not defined.**
- VI. Conclusión.** **Error! Bookmark not defined.**
- REFERENCIAS.** **Error! Bookmark not defined.**



LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de especies de <i>Gossypium</i> en México.	17
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 LLCotton25.	25
Cuadro 4. Resumen de los elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x LLCotton25.	28
Cuadro 5. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México.....	32
Cuadro 6. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	38
Cuadro 7. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	38
Cuadro 8. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	39
Cuadro 9. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	39
Cuadro 10. Resumen de características agronómicas evaluadas en el algodón GL y convencional.....	41
Cuadro 11. Resumen de características de calidad de fibra de algodón GL y convencional.	41
Cuadro 12. Sondas utilizadas en el análisis de hibridación <i>Southern Blot</i> del algodón GHB614.	48
Cuadro 13. Fragmentos de hibridación esperados y observados para el análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614.....	48
Cuadro 14. Verificación del DNA insertado del algodón con el evento de transformación LLCotton25 – resultados esperados y obtenidos de la hibridación.	50
Cuadro 15. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	53
Cuadro 16. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	54
Cuadro 17. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	54
Cuadro 18. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	55
Cuadro 19. Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTEM2.	56
Cuadro 20. Elementos genéticos del vector pGSV71 que fueron insertados en el genoma de la planta.....	57
Cuadro 21. Análisis de segregación del evento GHB614.....	60
Cuadro 22. Análisis de segregación del Evento de Transformación LLCotton25.....	63
Cuadro 23. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	65
Cuadro 24. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	65
Cuadro 25. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	66
Cuadro 26. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	66



Cuadro 27. Resumen de los resultados de hibridación que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón GHB614.....	72
Cuadro 28. Elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x LLCotton25.	87
Cuadro 29. Resumen de los genes de selección utilizados para la obtención de los eventos parentales del algodón GHB614 x LLCotton25.	95
Cuadro 30. Superficie y cantidad de semilla a importar y/o movilizar para el programa experimental de algodón GL durante el ciclo PV-2017.....	108
Cuadro 31. Periodos de siembra regionales para el cultivo del algodón en México.	109
Cuadro 32. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GL en etapa experimental en Tamaulipas Norte.....	110
Cuadro 33. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México.....	110
Cuadro 34. Superficie de sitios Ramsar cercanos a los polígonos propuestos de liberación de algodón GL.	119
Cuadro 35. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	127
Cuadro 36. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	127
Cuadro 37. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.....	128
Cuadro 38. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.....	128
Cuadro 39. Ubicación de los ensayos de campo para la evaluación agronómica y fenotípica del algodón GL.	131
Cuadro 40. Resumen de características agronómicas evaluadas en el algodón GL y convencional.....	132
Cuadro 41. Resumen de características de calidad de fibra de algodón GL y convencional. ...	133
Cuadro 42. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México.....	137
Cuadro 43. Manejo agronómico del cultivo del algodón en en Tamaulipas Norte.....	152
Cuadro 44. Superficie sembrada con algodón en Estados Unidos 2013 – 2014.	172
Cuadro 45. Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados.....	180
Cuadro 46. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón GHB614 (OECD: BCS-GHØØ2-5).....	181
Cuadro 47. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón LLCotton25 (OECD: ACS-GHØØ1-3).....	182
Cuadro 48. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón GHB614 x LLCotton25 (OECD: BCS-GHØØ2-5 x ACS-GHØØ1-3).....	182
Cuadro 49. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.	186
Cuadro 50. Espectro de control de maleza del herbicida glufosinato de amonio.....	187
Cuadro 51. Espectro de control de maleza del herbicida glifosato.	188
Cuadro 52. Consumo de combustible por el uso de tractor por tipo de labranza en Estados Unidos.	189
Cuadro 53. Ingrediente activo, formulación, dosis, categoría toxicológica y grupo químico de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.	193
Cuadro 54. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.	194
Cuadro 55. Ventajas y desventajas de los métodos de manejo de maleza.	197



Cuadro 56. Ingrediente activo, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos plaga en algodón (PLM, 2014).204

Cuadro 57. Superficie sembrada con cultivos biotecnológicos por país durante 2015.....212

Cuadro 58. Especies de *Gossypium* reportadas en la literatura para el Norte de México....**Error! Bookmark not defined.**

Cuadro 59. Algunos criterios utilizados en la evaluación del riesgo de resistencia de malezas a herbicidas. **Error! Bookmark not defined.**

Cuadro 60. Algunos criterios utilizados en la evaluación del riesgo de resistencia de malezas a herbicidas. **Error! Bookmark not defined.**



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de especies de algodón silvestre en México.....	19
Figura 2. Mapa de distribución del género <i>Gossypium</i> en México (REMIB-CONABIO, 2006)...	20
Figura 3. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GL - Hibridización con la sonda del T-DNA de GHB614 para evaluar la estabilidad estructural de la línea parental GHB614.....	37
Figura 4. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GL - Hibridización con la sonda del T-DNA de LLCotton25 para evaluar la estabilidad estructural de la línea parental LLCotton25.	37
Figura 5. Productos de PCR generados a través del inserto en algodón GHB614.....	43
Figura 6. Estrategia de amplificación <i>Gossypium hirsutum</i> evento LL25.....	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.	48
Figura 9. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda intron1 h3At+TPotp C.....	48
Figura 10. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda <i>2mepsps</i>	48
Figura 11. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda 3'histonAt.	48
Figura 12. Verificación del inserto en el algodón GHB614 – sonda del T-DNA completo.	49
Figura 13. Esquema del T-DNA del evento LLCotton25 mostrando la estrategia de hibridación.	50
Figura 14. Esquema del T-DNA del evento LLCotton25 mostrando la estrategia de hibridación.	51
Figura 15. Mapa del vector pTEM2.....	56
Figura 16. Diagrama del T-DNA del plásmido pTDL008.....	56
Figura 17. Mapa del vector pGSV71.....	57
Figura 18. Diagrama del desarrollo del evento GHB614.	58
Figura 19. Diagrama del desarrollo del algodón GHB614.	59
Figura 20. Diagrama del desarrollo del evento LLCotton25.....	61
Figura 21. Diagrama del desarrollo del algodón LLCotton25.....	62
Figura 22. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x LLCotton25.....	64
Figura 23. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x LLCotton25.....	69
Figura 24. Esquema del vector pTEM2 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.	72
Figura 25. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT001 y T-DNA (PT006).....	73
Figura 26. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT002 y T-DNA (PT006).....	73
Figura 27. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT003 y T-DNA (PT006).....	73
Figura 28. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT004 y T-DNA (PT006).....	73
Figura 29. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT005 y T-DNA (PT006).....	73
Figura 30. Esquema del vector pGSV71 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.	76
Figura 31. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda <i>aadA</i>	77
Figura 32. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda <i>5'pVS1ori</i>	77



Figura 33. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda 3'pVS1ori.	77
Figura 34. Análisis <i>Southern blot</i> del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda <i>ColE1</i>	77
Figura 35. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS.	78
Figura 36. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína PAT codificada por el gen <i>bar</i> de la bacteria <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	78
Figura 37. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS.	79
Figura 38. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.	80
Figura 39. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.	82
Figura 40. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS.	83
Figura 41. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.	85
Figura 42. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.	86
Figura 43. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.	97
Figura 44. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.	98
Figura 45. 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.	99
Figura 46. Estabilidad del evento GHB614 generación T3.	99
Figura 47. Estabilidad del evento GHB614 generación T4.	100
Figura 48. Estabilidad del evento GHB614 generación T5.	100
Figura 49. Estabilidad del evento GHB614 generación T6.	100
Figura 50. Estabilidad del evento GHB614 generación BC ₂ F ₂	100
Figura 51. 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.	100
Figura 52. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T ₄).	100
Figura 53. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T ₄).	101
Figura 54. Estabilidad del evento LL25 (FM966 – Generacion: BC3/F3).	101
Figura 55. Estabilidad del evento LL25 (FM832 – Generacion: BC3/F3 (semillas lote A)).	101
Figura 56. Estabilidad del evento LL25 (AVS9023 – Generation: BC3/F3).	101
Figura 57. Esquema de la estrategia de hibridación para el análisis de la estabilidad estructural de los eventos combinados GHB614 x LLCotton25.	101
Figura 58. Demostración de la estabilidad estructural de GHB614 en GHB614 x LLCotton25	102
Figura 59. Demostración de la estabilidad estructural de LLCotton25 en GHB614xLLCotton25	102
Figura 60. Polígono propuesto para la liberación de algodón GL en etapa experimental en la región agrícola de Tamaulipas Norte.	108
Figura 61. 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® LibertyLink®.	111
Figura 62. Sitios de liberación de algodón GlyTol® LibertyLink® en la región de Tamaulipas Norte.	116
Figura 63. Áreas Naturales Protegidas aledañas al polígono de liberación en Tamaulipas Norte.	117
Figura 64. Sitios Ramsar cercanos a el polígono de liberación de algodón GL en en la región de Tamaulipas Norte.	119



Figura 65. Regiones ecológicas nivel IV que se traslapan con la región agrícola de Tamaulipas Norte.....	120
Figura 66. Ruta de movilización de Cd. Juárez a Delicias, Chih.....	121
Figura 67. 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.....	123
Figura 68. Estabilidad del evento GHB614 generación T3.	123
Figura 69. Estabilidad del evento GHB614 generación T4.	123
Figura 70. Estabilidad del evento GHB614 generación T5.	123
Figura 71. Estabilidad del evento GHB614 generación T6.	123
Figura 72. Estabilidad del evento GHB614 generación BC ₂ F ₂	123
Figura 73. 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 74. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T ₄).	124
Figura 75. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T ₄).	124
Figura 76. Estabilidad del evento LL25 (FM966 – Generacion: BC3/F3).....	124
Figura 77. Estabilidad del evento LL25 (FM832 – Generacion: BC3/F3 (semillas lote A)).	124
Figura 78. Estabilidad del evento LL25 (AVS9023 – Generation: BC3/F3).....	124
Figura 79. Esquema de la estrategia de hibridación para el análisis de la estabilidad estructural de los eventos combinados GHB614 x LLCotton25.	125
Figura 80. Demostración de la estabilidad estructural de GHB614 en GHB614 x LLCotton25	125
Figura 81. Demostración de la estabilidad estructural de LLCotton25 en GHB614xLLCotton25	125
Figura 82. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.....	149
Figura 83. Almacén de Bayer de México ubicado en Delicias, Chih.	164
Figura 84. Condiciones de almacenamiento y seguridad del almacén.	165
Figura 85. Regiones productoras de algodón de los Estados Unidos (<i>Cotton belt</i>).	173
Figura 86. Principales tipos climáticos de Estados Unidos.	173
Figura 87. 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).	186
Figura 88. Incremento cronológico en el número de malezas resistentes a herbicidas pertenecientes a distintos grupos (Heap, 2015).	191
Figura 89. Número de especies resistentes a herbicidas por cultivo (Heap, 2015).....	195
Figura 90. Número de especies resistentes a herbicidas individuales (Heap, 2015).	196
Figura 91. Gusano bellotero (<i>Helicoverpa zea</i>).	198
Figura 92. Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>).....	198
Figura 93. Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>).	199
Figura 94. Gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>).	200
Figura 95. Mosquita blanca (<i>Bemisia argentifolii</i>).	200
Figura 96. Picudo del algodonoero (<i>Anthonomus grandis</i>).....	201
Figura 97. Conchuela del algodón (<i>Chlorochroa ligata</i> Say).....	201
Figura 98. Chinche Lygus (<i>Lygus</i> spp.).....	202
Figura 99. Daño por trips en el cultivo de algodón.	203
Figura 100. Pulgón del algodón (<i>Aphis gossypii</i>).....	203
Figura 101. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.	210
Figura 102. Adopción global de los principales cultivos biotecnológicos durante 2015.....	213
Figura 103. Adopción global de cultivos biotecnológicos por característica 1996 - 2015.....	214



Figura 104. Impacto de la adopción de cultivos biotecnológicos 1996 - 2014.215

Figura 105. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 106. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.**Error! Bookmark not defined.**

Figura 107. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 108. Morfología de la flor del algodón. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 109. Etapas de la floración del algodón..... **Error! Bookmark not defined.**



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

1. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DE QUIEN PROMUEVE

Bayer de México, S.A. de C.V.
Miguel de Cervantes Saavedra No. 259
Col. Granada
11520 México, D. F.



I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM

I.a. Identificador único del evento de transformación

Los identificadores únicos OECD para el algodón GHB614 (**BCS-GHØØ2-5**) x LLCotton25 (**ACS GHØØ1-3**), 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 LLCotton25
 Algodón GHB614 x LL25
 Algodón BCS-GHØØ2-5 x ACS GHØØ1-3
 Algodón GlyTol® LibertyLink®
 Algodón GL

El algodón GL combina la expresión de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (LLCotton25) 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.

I.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](#)).

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.

¹ <http://bch.biodiv.org/>

² <http://www2.oecd.org/biotech/>

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



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

Especie	Ubicación Estado: Localidades y/o Municipios
<i>G. armourianum</i>	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: Tecomatlán, Jolalpan, San Pedro de las Palmas, Tecuautitlán San Martín. 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.
<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.



Especie	Ubicación Estado: Localidades y/o Municipios
	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, Ajoaya. 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.

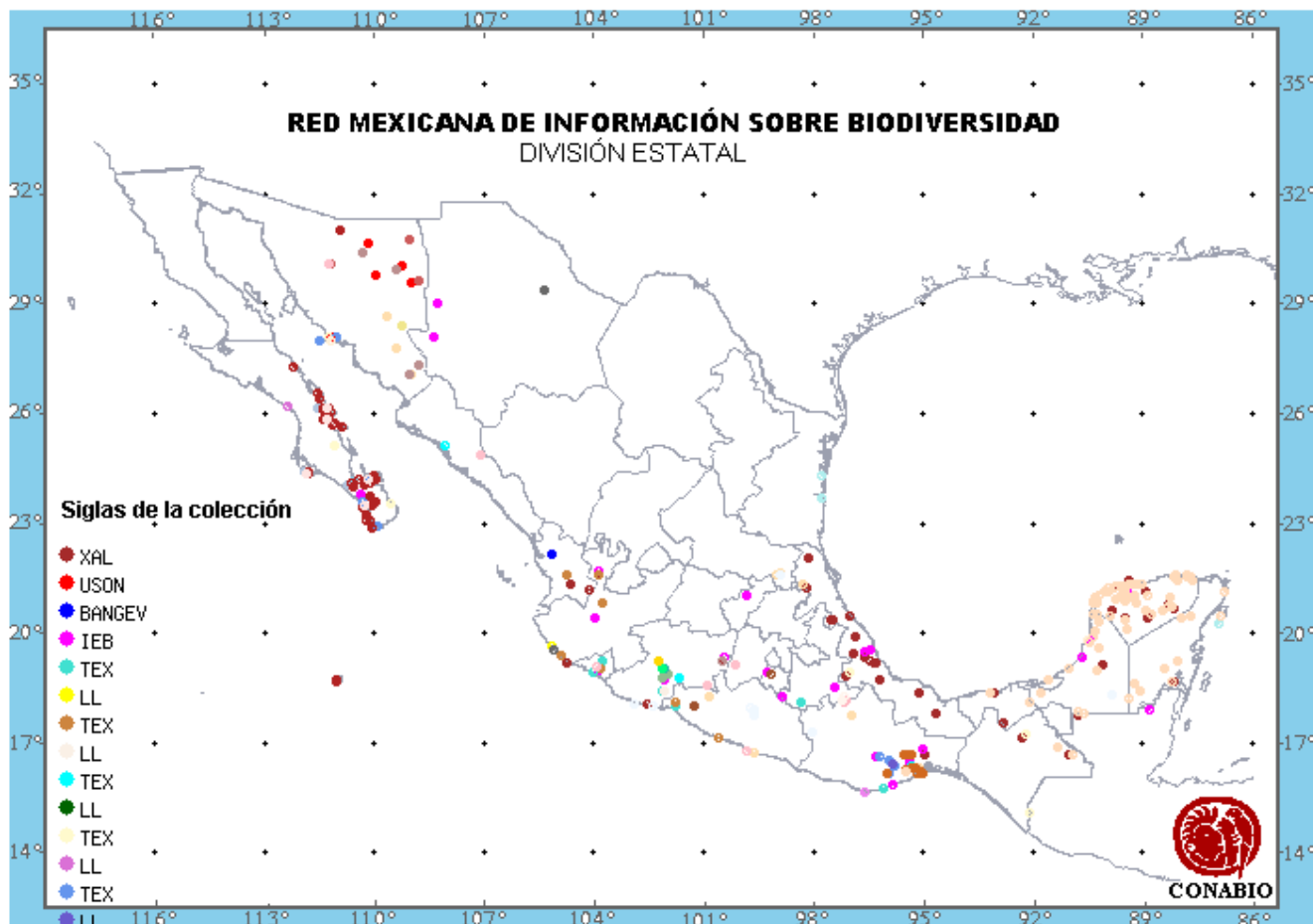
Figura 1. Distribución de especies de algodón silvestre en México.



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).

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

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.



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 Vascular 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)

I.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> Brandegeee	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.

I.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® LibertyLink® 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.

El nuevo rasgo incorporado, la tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, no hacen diferente al algodón GlyTol® LibertyLink® de su contraparte convencional aparte de presentar la ventaja 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 en 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.

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.

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.



Profundidad de suelo:

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

Salinidad:

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

pH:

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

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

1. Organismo receptor.

El organismo receptor para los eventos GHB614 x LLCotton25 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 LLCotton25.

Los organismos donadores de los genes presentes en el evento combinado mediante cruzamiento convencional algodón GHB614 x LLCotton25 se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resumen de los genes insertados en los eventos parentales del algodón GHB614 x LLCotton25.

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
LLCotton25	<i>bar</i>	Bacteria (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)	Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación

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



3. Identificación de los organismos donadores para los eventos GHB614, LLCotton25.

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	<i>Zea</i> L.
Especie	<i>Zea mays</i> L.

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

3.2. *Streptomyces hygroscopicus*.

Streptomyces hygroscopicus 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 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. 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>)

3.3. Historial de uso seguro de los organismos donantes.

Las especies donantes de los genes *2mepsps* y *bar* son plantas utilizadas comúnmente como alimento humano o animal, o bien bacterias que habitan de manera natural en el suelo 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/>).

La bacteria *Streptomyces hygrosopicus* no es utilizada como alimento humano ni como alimento o suplemento en nutrición animal. Esta bacteria utilizada como donante de genes no tiene antecedentes de ser tóxica para humanos o animales (OECD, 2007; OECD, 1999). Adicionalmente, es importante considerar que para la obtención del algodón GHB614 x LLCotton25 no se utilizan bacterias completas sino solo uno de sus genes. Los estudios bioinformáticos 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 LLCotton25 se presentan en el [cuadro 4](#). Aunque algunas secuencias reguladoras se derivan de patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens* y virus del mosaico de la coliflor (CaMV), estas secuencias no tienen capacidad de inducir enfermedades en el algodón.



Cuadro 4. Resumen de los elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x LLCotton25.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

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 lineal 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. Éstos 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. 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



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

Especie Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)

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

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

Tecnología GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25)

Bayer CropScience NV
Belgium

Bayer CropScience LP
USA

Semilla (variedades FiberMax™)

Bayer CropScience
Seeds Innovation Center
USA

I.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):

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



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.

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> Brandegeee	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. 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 Brandegeee, 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.

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 ovals 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.

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



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.

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

1. Doble apilado GL (GHB614 x LLCotton25).

El algodón GL fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614 y LLCotton25 de Bayer. El evento GHB614 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína 2mEPSPS derivada del maíz (*Zea mays* L.). El evento LLCotton25 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de la proteína PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La combinación de estos eventos en el algodón GL provee de tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.

Los resultados de los estudios *Southern blot*, bio-informáticos y PCR realizados en los eventos GHB614 y LLCotton25 demostraron el correcto patrón de integración del T-DNA, la equivalencia de las regiones flanqueantes y el tamaño de las bandas esperadas para cada gen,



usando combinaciones de sondas y enzimas de restricción para caracterizar el DNA insertado. Asimismo, se demostró 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.

El análisis *Southern blot* del *locus* transgénico de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GL. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente (Habex & Lecleir, 2014⁹; De Beuckeleer, 2004¹⁰) y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GL. Como era de esperarse, en el evento apilado se presentaron las bandas específicas de cada uno de los eventos. Con base en los resultados del análisis *Southern blot*, se confirmó que el producto apilado GlyTol® LibertyLink® contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**¹¹).

Para evaluar la estabilidad de los insertos individuales GHB614 y LLCotton25 en el evento apilado GL, el DNA genómico de plantas de algodón GL fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV* y *NcoI* después de la hibridación con las sondas correspondientes del T-DNA, se determinó que todas las plantas de algodón GL analizadas mostraron fragmentos de tamaño comparable a los fragmentos obtenidos de las líneas parentales individuales para cada inserto lo cual demostró la estabilidad en el evento apilado GL (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**) (Figura 3 - 4).

Figura 3. Análisis *Southern blot* del algodón GL - Hibridización con la sonda del T-DNA de GHB614 para evaluar la estabilidad estructural de la línea parental GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 4. Análisis *Southern blot* del algodón GL - Hibridización con la sonda del T-DNA de LLCotton25 para evaluar la estabilidad estructural de la línea parental LLCotton25.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

En adición al análisis de integridad y estabilidad estructural descrito anteriormente, se determinaron los niveles de expresión de las proteínas 2mEPSPS y PAT/*bar* para el evento apilado GL en hoja, cuadros y semilla en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V7, inicio de cuadros y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo con y sin aplicaciones de herbicida, establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos durante el ciclo 2012

⁹ Habex, V.; Lecleir, M. 2014. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. Innovation Center. Belgium. M-279390-05-1.

¹⁰ De Beuckeleer, M. 2004. *Gossypium hirsutum* elite event LLCotton25. Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services. Belgium. M-201049-02-1.

¹¹ Currier, T. 2008. Structural stability analysis of cotton event GlyTolxLL. Study Number BK08Q002. Molecular & Biochemical Analytical Services. Research Triangle Park, NC 27709. M-31042901-1.



(**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**¹²). Los resultados de la determinación del nivel de expresión de las proteínas se presentan en los Cuadros 6 - 9.

Cuadro 6. Niveles de expresión de la proteína **2mEPSPS** en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	156 ± 98	76.6 – 459	726 ± 310	500 – 1,520
		GHB614 x LLCotton25	124 ± 70	54.3 - 357	641 ± 240	359 – 1,130
	Raíz	GHB614	15.2 ± 3.0	9.01 - 19.6	75.5 ± 25	41.8 - 132
		GHB614 x LLCotton25	13.3 ± 3.9	4.68 - 18.6	976.0 ± 36	20.4 - 149
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	92.8 ± 38	37.8 - 161	457 ± 140	249 - 676
		GHB614 x LLCotton25	84.3 ± 34	30.7 - 136	493 ± 190	251 - 883
	Bellotas inmaduras	GHB614	32.1 ± 19	11.9 - 71.1	199 ± 110	86.5 - 405
		GHB614 x LLCotton25	29.9 ± 20	9.08 - 62.6	221 ± 140	95.5 - 489
Madurez	Semilla con borra	GHB614	99.3 ± 12	80.8 - 128	113 ± 13	96.7 - 143
		GHB614 x LLCotton25	96.0 ± 9.3	81.1 - 114	109 ± 11	93.3 - 127

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 7. Niveles de expresión de la proteína **2mEPSPS** en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	138 ± 71	60.7 - 300	704 ± 270	339 - 1,230
		GHB614 x LLCotton25	134 ± 85	43.4 - 405	704 ± 290	386 - 1,360
	Raíz	GHB614	15.6 ± 2.9	10.7 - 19.2	86.9 ± 26	59.7 - 133
		GHB614 x LLCotton25	13.9 ± 2.5	9.61 - 17.5	72.8 ± 20	42.1 - 110
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	86.3 ± 29	57.9 - 162	460 ± 140	275 - 679
		GHB614 x LLCotton25	83.8 ± 32	35.6 - 147	488 ± 180	283 - 772
	Bellotas inmaduras	GHB614	24.5 ± 14	10.9 - 49.2	165 ± 66	96.9 - 279
		GHB614 x LLCotton25	25.1 ± 14	10.7 - 50.9	173 ± 38	127 - 241
Madurez	Semilla	GHB614	82.4 ± 16	47.6 - 112	93.0 ± 19	53.6 - 123

¹² Jeffries, T. A. 2013. GHB614 x LLCotton25 – Production and Protein Expression Analyses of Field Grown Samples. USA, 2012. Study Number 12-RSXFT009. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC 27709. M-447807-01-1



Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
	con borra	GHB614 x LLCotton25	85.5 ± 13	62.1 - 116	97.1 ± 16	71.6 - 126

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 8. Niveles de expresión de la proteína **LLCotton25** en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	147 ± 40	96.7 - 240	860 ± 100	749 - 1,030
		GHB614 x LLCotton25	136 ± 40	84.2 - 210	727 ± 87	576 - 855
	Raíz	GHB614	46.6 ± 9.3	29.6 - 67.6	232 ± 50	143 - 335
		GHB614 x LLCotton25	40.3 ± 5.2	28.7 - 51.0	222 ± 62	136 - 356
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	172 ± 48	118 - 270	941 ± 160	716 - 1,150
		GHB614 x LLCotton25	182 ± 29	116 - 238	1,090 ± 180	814 - 1,460
	Bellotas inmaduras	GHB614	61.8 ± 37	14.5 - 135	461 ± 290	87.4 - 884
		GHB614 x LLCotton25	86.5 ± 55	26.8 - 184	634 ± 380	296 - 1,380
Madurez	Semilla con borra	GHB614	180 ± 31	130 - 237	204 ± 33	150 - 248
		GHB614 x LLCotton25	179 ± 25	135 - 233	203 ± 27	164 - 256

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 9. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	144 ± 50	60.8 - 276	775 ± 160	437 - 945
		GHB614 x LLCotton25	144 ± 52	85.5 - 279	788 ± 100	667 - 995
	Raíz	GHB614	41.8 ± 7.0	32.8 - 62.8	224 ± 50	170 - 347
		GHB614 x LLCotton25	40.1 ± 4.7	30.1 - 48.3	209 ± 47	158 - 302
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	156 ± 67	62.4 - 275	884 ± 400	360 - 1,490
		GHB614 x LLCotton25	149 ± 60	63.4 - 263	921 ± 450	322 - 1,620
	Bellotas inmaduras	GHB614	54.9 ± 25	15.5 - 97.4	407 ± 160	127 - 645
		GHB614 x LLCotton25	58.1 ± 22	31.4 - 113	435 ± 110	242 - 600



Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
Madurez	Semilla con borra	GHB614	157 ± 24	97.2 - 221	178 ± 26	131 - 234
		GHB614 x LLCotton25	162 ± 22	130 - 205	183 ± 22	153 - 224

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Salvo la característica de tolerancia a los herbicidas glifosato (gen *2mepsps*), y glufosinato de amonio (gen *bar*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón GL. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas en el algodón GL (heredadas de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25) no le confieren ninguna característica fenotípica adicional. Este evento de algodón biotecnológico no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional o con los eventos parentales individuales.

Por otro lado, las proteínas citadas 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 la característica de tolerancia a herbicidas otorgue al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas GL 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 evento apilado GL, ni en los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de apilamiento de las características introducidas mediante cruzamiento convencional, cuando se los compara con el algodón convencional. Por lo tanto, es posible afirmar que, salvo por la tolerancia a herbicidas, el algodón GL es fenotípicamente igual que los algodones convencionales, tanto en México como en otras regiones del mundo.

El evento GL no exhibe ninguna característica fenotípica adicional que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso poco probable de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de la característica de tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato, a especies en hábitats no agrícolas no conferiría ventaja competitiva alguna, dado que la tecnología funciona como una protección ante estímulos externos como la aplicación de los herbicidas mencionados, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional.

La evaluación agronómica y fenotípica del algodón **GL** 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 2007. Los ensayos fueron conducidos de acuerdo con las prácticas de manejo comerciales en cada región algodoneera.



El resultado del desempeño agronómico se presenta en el cuadro 10, donde se aprecia el promedio de las variables obtenidas de los 8 predios.

Cuadro 10. Resumen de características agronómicas evaluadas en el algodón GL y convencional.

Parametro	FM 958 (a) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL sin tratamiento (b) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL con tratamiento (b) ± SD	SIG **	LSD (0.05)
Nacesncia (plantas/ft)	2.09 + 0.76	2.13 ±0.69	1.98 ±0.68		0.2
Altura de planta (cm)	85.08 ± 11.42	88.83 ± 8.88	88.07 ± 7.99		4.69
Nudos totales	21.33 ±2.97	21.35 ±3.07	21.36 ±3.29		0.48
Altura de Nudo	3.99 ± 0.69	4.16 + 0.68	4.12 + 0.69		0.23
Bellotas totales	12.88 ±6.23	12.21 + 5.50	12.74 + 6.27		1.6
Días a floracion	58.61 + 6.28	58.11 + 7.92	58.17 + 7.93		0.62
Porcentaje de apertura	52.59+ 10.29	49.58 + 12.80*	49.8 + 8.11*	**	2.46
Uniformidad	1.75 ±0.89	1.67 ±0.82	1.79 ±0.98		0.24
Acame	1.21 ±0.5	1.21 ±0.50	1.13 ±0.45		0.09
Tipo de bellota	5.75 ± 2.28	5.79 ±2.30	5.88 ±2.36		0.17

Cuadro 11. Resumen de características de calidad de fibra de algodón GL y convencional.

Parametro	FM 958 (a) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL sin tratamiento (b) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL con tratamiento (b) ± SD	SIG **	LSD (0.05)
Rendimiento (Kg/Ha)	834.53 ± 224	796.7 ± 179.37	788.03 ± 181.26		68.85
Longitud de fibra	1.17 ±0.38	1.17 ±0.04	1.18 ±0.04		0.02
Resistencia de la fibra	33.63 + 2.06	33.3 + 2.32	33.38+ 1.85		0.59
Micronaire	4.94 + 0.401	4.76 + 0.41*	4.70 + 0.32*	**	0.2
Uniformidad	84.78+ 14.12	84.72+ 15.02	84.44+ 15.20		0.47

SD= Desviacion estaandar

SIG*= Indica una diferencia significativa con el parental

LSD= (Least Significant Difference) Diferencia Mínima Significativa en 0,05

Los resultados indican que los valores de las variables evaluadas en el algodón GL están dentro del rango determinado para las variedades comerciales de referencia (convencionales), lo que demuestra la equivalencia agronómica y fenotípica del algodón GL con relación al algodón convencional (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**¹³).

¹³ Trolinder-Wright, L. 2008. Agronomic Performance of Glyphosate and Glufosinate tolerant Cotton based upon stacked events GHB614 x LLCotton25 (GlyTol x LL cotton) In the 2007 USA production season. Bayer CropScience. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38 9052 GENT, Belgium. M-304575-01-1.



2. 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 5). La secuencia detallada del evento GHB614, el sitio de inserción y los oligonucleótidos usados para su caracterización se presentan en el **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**¹⁴.

¹⁴ Habex, V. 2007. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V. M-278542-02-1.



Figura 5. Productos de PCR generados a través del inserto en algodón GHB614.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

3. Evento LLCotton25.

El algodón LLCotton25 se produjo, utilizando el plásmido pGSV71, por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. Este plásmido PGSV71 lleva un gen quimérico que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (P35S3-bar-3'nos). Mediante pruebas de PCR y Southern blot de ADN genómico del evento LLCotton25 se demostró la inserción de una copia del ADN-T del plásmido pGSV71 (V. Habex, 2001¹⁵ y M. De Beuckeleer, 2001¹⁶).

El ADN genómico extraído de tejidos de hojas cosechadas se sometió a protocolo D-PCR PGS00100 (M. De Beuckeleer, 2004¹⁷), donde se pudo confirmar la presencia del evento LL25 en las muestras transgénicas y la ausencia del evento en las muestras no transgénicas. Estos fragmentos se amplificaron utilizando los iniciadores MAE11 (para la secuencia flanqueante 5') y MLD19 (para la secuencia flanqueante 3') como se indica en la figura 6, el cual mostro el tamaño esperado (fragmento BPC026 de 2597 pb).

Este fragmento (BPC026), representa la inserción completa de algodón evento LLCotton25, se amplificó utilizando un sistema de PCR de alta fidelidad. Se secuenció y la secuencia obtenida se comparó con la secuencia del plásmido pGSV71 putativo. Cualquier diferencia en la secuencia observada, entre el inserto LLCotton25 y la secuencia de ADN de plásmido putativo, fue verificada por la re-amplificación y determinación de la secuencia posterior de la región correspondiente de la pieza de inserción LLCotton25 y el plásmido de transformación.

La determinación de la secuencia confirmó que las delecciones, inserciones y sustituciones observadas en el evento LLCotton25 también estaban presentes en el plásmido transformante pGSV71. La determinación de secuencias insertadas en *Gossypium hirsutum* evento LLCotton25 confirmó la presencia de una copia del ADN-T, la cual es completamente idéntica a las correspondientes secuencias de ADN plásmido transformante.

La secuencia del algodón (*Gossypium hirsutum*) evento LL25 resultante se presenta en el **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**¹⁸. La secuencia del inserto se inicia con dos pares de bases residuales de la secuencia del borde derecho, posteriormente 27 pb correspondientes a secuencias *polylinker*, continua con 1384 pb de la región promotora de la transcripción del virus del mosaico de la coliflor 35S (P35S3), 551 pb de la secuencia de codificación del gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*, nuevamente 18 pb de una secuencia *polylinker*, un fragmento de 260 pb TaqI desde el extremo 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa (3'nos) del T-DNA de pTiT37; nuevamente una secuencia *polylinker* de 50pb y termina con 21 pares de bases

¹⁵ Habex, V. 2001. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event LL25. Bayer BioScience N.V. M-207086-02-1.

¹⁶ De Beuckeleer, M. 2001. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event LL25. Aventis CropScience NV. Belgium. M-207086-01-1.

¹⁷ De Beuckeleer, M. 2004. *Gossypium hirsutum* elite event LLCotton25 Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services. Bayer BioScience N.V. Belgium. M-201049-02-1.

¹⁸ Berghman, S. & De Beuckeleer, M. 2002. Determination of inserted transgenic sequences in *Gossypium hirsutum* elite event LL25. Aventis CropScience N.V. M-207874-01-1.



residuales del borde izquierda dando un número total de pares de bases insertadas es 2597 **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**¹⁹.

Figura 6. Estrategia de amplificación *Gossypium hirsutum* evento LL25.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

I.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 LLCotton25 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 LLCotton25 se describen en el inciso anterior (I.h.).

1. Secuencias flanqueantes.

1.1. Doble apilado (GHB614 x LLCotton25).

El algodón GL fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614 y LLCotton25. El evento GHB614 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína 2mEPSPS derivada del maíz (*Zea mays* L.). El evento LLCotton25 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de la proteína PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La combinación de estos eventos en el algodón GL provee tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.

Los resultados de los estudios *Southern blot*, bio-informáticos y PCR realizados en los eventos GHB614 y LLCotton25 demostraron el correcto patrón de integración del T-DNA, la equivalencia de las regiones flanqueantes y el tamaño de las bandas esperadas para cada gen, usando combinaciones de sondas y enzimas de restricción para caracterizar el DNA insertado. Asimismo, se demostró 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.

El análisis *Southern blot* del *locus* transgénico de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GL. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente (Habex & Leclair, 2014²⁰; De Beuckeleer, 2004²¹)

¹⁹ Habex, V.; Leclair, M. 2014. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. Innovation Center. Belgium. M-279393-01-1.

²⁰ Habex, V.; Leclair, M. 2014. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. Innovation Center. Belgium. M-279390-05-1.



y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GL. Como era de esperarse, en el evento apilado se presentaron las bandas específicas de cada uno de los eventos. Con base en los resultados del análisis *Southern blot*, se confirmó que el producto apilado GL contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**²²).

1.2. 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 delección 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 se presentan en el **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**²³.

1.3. Evento LLCotton25.

El algodón LLCotton25 se produjo, utilizando el plásmido pGSV71, por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. Este plásmido PGSV71 lleva un gen quimérico que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (P35S3-bar-3'nos). Mediante pruebas de PCR y *Southern blot* de ADN

²¹ De Beuckeleer, M. 2004. *Gossypium hirsutum* elite event LLCotton25. Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services. Belgium. M-201049-02-1.

²² Currier, T. 2008. Structural stability analysis of cotton event GlyTolxLL. Study Number BK08Q002. Molecular & Biochemical Analytical Services. Research Triangle Park, NC 27709. M-31042901-1.

²³ Habex, V. 2007. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V. M-278542-02-1.



genómico del evento LLCotton25 se demostró la inserción de una copia del ADN-T del plásmido pGSV71 (V. Habex, 2001²⁴ y M. De Beuckeleer, 2001²⁵).

Se analizó las características de las secuencias flanqueantes, como es el caso de la naturaleza de las secuencias, esto mediante el análisis por PCR utilizando pares de iniciadores (*primers*) dirigidos a las secuencias que flanquean el borde derecho y el borde izquierdo de *Gossypium hirsutum* evento LL25. Donde en una primera reacción de PCR se demostró la especificidad de los fragmentos de integración de borde derecho e izquierdo. Una segunda reacción de PCR utilizando un par de iniciadores, específicos para las secuencias flanqueantes, se demostró que las secuencias flanqueantes del algodón con el evento LL25, son de origen de la planta de *Gossypium hirsutum* demostrado su naturaleza.

Las secuencias utilizadas fueron de 677 pb de DNA del borde flaqueaste derecho y 412 pd de DNA del borde flaqueante izquierdo, las cuales se presentan y se describen en el **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**²⁶. Estas secuencias se compararon utilizando el algoritmo *BLAST* (SYNERGY), con las bases de datos *GenBank*, *EMBK*, *DDBJ* y el *AP*, no se informó de similitudes significativas con la secuencia.

El par de iniciadores MAE011 MAE012 amplificó 219 pb del fragmento de secuencia de flaqueo borde derecho del evento LL25 y de la variedad de algodón convencional. Este resultado demostró que la secuencia flaqueante del borde derecho (5') del evento LL25 también está presente en el ADN de tipo convencional de *Gossypium hirsutum*. El par de iniciadores MAE014-MAE015 amplificó 344 pb del borde flaqueante izquierdo del fragmento de secuencia del evento LL25 en las dos muestrass de *Gossypium hirsutum* (convencional y modificado). Este resultado demuestra que la secuencia del borde flaqueante izquierdo (3') del evento LL25 también están presentes en el ADN de tipo convencional de *Gossypium hirsutum*.

2. Número de copias.

2.1. Doble apilado (GHB614 x LLCotton25).

El algodón GL fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614 y LLCotton25. El evento GHB614 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína 2mEPSPS derivada del maíz (*Zea mays* L.). El evento LLCotton25 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de la proteína PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La combinación de estos eventos en el algodón GL provee tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.

Los resultados de los estudios *Southern blot*, bio-informáticos y PCR realizados en los eventos GHB614 y LLCotton25 demostraron el correcto patrón de integración del T-DNA, la equivalencia de las regiones flanqueantes y el tamaño de las bandas esperadas para cada gen,

²⁴ Habex, V. 2001. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event LL25. Bayer BioScience N.V. M-207086-02-1.

²⁵ De Beuckeleer, M. 2001. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event LL25. Aventis CropScience NV. Belgium. M-207086-01-1.

²⁶ Aerts, M.; De Beuckeleer, M. 2002. Analysis of the nature of the flanking sequences from *Gossypium hirsutum* event LL25. Aventis CropScience NV. Belgium. M-215510-01-1.



usando combinaciones de sondas y enzimas de restricción para caracterizar el DNA insertado. Asimismo, se demostró 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.

El análisis *Southern blot* del *locus* transgénico de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GL. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente (Habex & Leclair, 2014²⁷; De Beuckeleer, 2004²⁸) y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GL. Como era de esperarse, en el evento apilado se presentaron las bandas específicas de cada uno de los eventos. Con base en los resultados del análisis *Southern blot*, se confirmó que el producto apilado GL contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**²⁹).

2.2. 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 *loci* de integración en el genoma del algodón), número de copias (número de transgenes en un *locus* individual), 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 12). El algodón convencional Coker 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 12, Figura 7).

²⁷ Habex, V.; Leclair, M. 2014. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. Innovation Center. Belgium. M-279390-05-1.

²⁸ De Beuckeleer, M. 2004. *Gossypium hirsutum* elite event LLCotton25. Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services. Belgium. M-201049-02-1.

²⁹ Currier, T. 2008. Structural stability analysis of cotton event GlyTolxLL. Study Number BK08Q002. Molecular & Biochemical Analytical Services. Research Triangle Park, NC 27709. M-31042901-1.



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 12. 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 (Scott *et al.*, 2006; **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**³⁰) (Figuras 8 - 10).

Cuadro 13. 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.

³⁰ Habex, V.; Leclair, M. 2014. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GH8614. Bayer CropScience N.V. Innovation Center. Belgium. M-279393-01-1.



INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

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

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2.2. Evento LLCotton25.

Se introdujo una construcción del gen *bar*, que codifica la tolerancia a herbicidas en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*). El análisis molecular demostró que una copia del casete del gen *bar* está integrado en el algodón con el evento LL25. Mediante un análisis de PCR se demostró la repetición terminal Derecha no está situada dentro del evento LL25 y que el punto final del T-DNA del evento LL25 tiene que ser situado dentro de la secuencia de repetición terminal del borde izquierdo.

El iniciador MAE020 (específico para la secuencia de borde derecho 5') y el iniciador MLD015 (específico para la secuencias transgénicas p35S) amplifican el fragmento esperado de 410 pb con ADN genómico de algodón CokerC312-17 fortificado con $\pm 2,5$ copias del plásmido de transformación pGSV71. Este par de iniciadores no amplifican cualquier fragmento con DNA genómico aislado del evento LL25. Los iniciadores MAE021 (específico a 5 pb del borde derecho y 16 pb de secuencias de ADN-T) y el iniciador MLD015 (específico para la secuencias transgénicas p35S) amplifican el fragmento esperado de 390 pb con ADN genómico de algodón CokerC312-17 fortificado con $\pm 2,5$ copias del plásmido de transformación pGSV71. Este par de iniciadores amplificó el fragmento de 390 pb con ADN genómico aislado del evento LL25. El ADN genómico de tipo convencional y el "Control Sin Tratamiento" no mostraron ninguna amplificación con los pares de iniciadores usados, esto indica que no existe amplificación detectable del transgen en muestras de ADN genómico y el Master Mix PCR, lo cual demuestra que, como era de esperar, que las copias del borde derecho (5') no está insertada en el evento LL25.

El iniciador MAE019 (específico para la secuencia de borde izquierdo 3') y el iniciador DPA140 (específico para la secuencias transgénicas 3'nos) amplifican el fragmento esperado de 211 pb con ADN genómico de algodón CokerC312-17 fortificado con $\pm 2,5$ copias del plásmido de transformación pGSV71. Este par de iniciadores también amplificaron el fragmento de 211 pb con ADN genómico aislado del evento LL25 El iniciador MAE023 (específico a 14 pb del borde izquierdo y 6 pb de la secuencia de la cadena principal del vector) y el iniciador DPA140 (específico para la secuencia transgénica 3'nos) amplificó el fragmento de 220bp de ADN genómico de algodón CokerC312-17 fortificado con $\pm 2,5$ copias del plásmido de transformación pGSV71. Este par de iniciadores no amplifican cualquier fragmento con DNA genómico aislado del evento LL25.

El ADN genómico de tipo convencional y el "Control Sin Tratamiento" no mostraron ninguna amplificación con los pares de iniciadores usados, esto indica que no existe amplificación detectable del transgen en muestras de ADN genómico y el Master Mix PCR, esto demostró



que el punto final de las secuencias insertadas del T-ADN tiene que ser situado dentro de la secuencia del borde izquierdo 3' **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**³¹.

Para verificar que el ADN insertado de *Gossypium hirsutum* evento de transformación LLCotton25 corresponde al ADN de plásmido, se realizó un análisis *Southern blot*. El ADN genómico de LLCotton25 fue digerido con diferentes enzimas de restricción, aplicando condiciones de concentración, buffer y temperatura recomendada por el fabricante. Se realizó la separación de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa, posteriormente se desnaturalizaron y se trasladaron a una membrana de Nylon a través de fuerza capilar. Los fragmentos se hibridaron de la secuencia completa de T-DNA, en la [Figura 13](#) se presenta esquemáticamente los diferentes fragmentos además de presentarse resumidos en el [cuadro 14](#). (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**³²)

[Figura 13](#). Esquema del T-DNA del evento LLCotton25 mostrando la estrategia de hibridación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Cuadro 14](#). Verificación del DNA insertado del algodón con el evento de transformación LLCotton25 – resultados esperados y obtenidos de la hibridación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

En la [Figura 8](#) se pueden apreciar los resultados expuestos en la tabla anterior, esto mediante un gel de agarosa en el cual se colocó un control negativo de ADN (ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica Coker312, carril 8) que se utilizó para confirmar la ausencia de hibridación, donde al final no mostró hibridación con la sonda de ADN-T; un control positivo de ADN (ADN genómico preparado a partir de un extracto de una planta no transgénica Coker312, fortificada con aproximadamente 1 copia de del plásmido de transformación pGSV71 digerido con *Bgl*I carril 7), utilizado para demostrar que la hibridación se realizó en condiciones que permiten la hibridación de la sonda con secuencias objetivo donde se pudieron observar los fragmentos de hibridación esperados de 1542 pb y 8013 pb y por ultimo un control de peso molecular (carril 1) Phage Lambda ADN digerido con *Pst*I, que cubre un rango de tamaño apropiado para los fragmentos que se espera que sean detectados en el *Southern blot*.

Además se incluyó ADN genómico de algodón con el evento LLCotton25 digerido con diferentes enzimas de restricción como se describe a continuación y se muestran en la [Figura 14](#).

- Digerido con la enzima *Sa*I (Carril 2), muestra los dos fragmentos internos de ADN-T esperados (584 pb y 1665 pb), se observa junto a los fragmentos internos de un fragmento de más de 14 kb. Este fragmento es el resultado de la digestión parcial del ADN genómico

³¹ Aerts, M. & De Beuckeleer, M. 2002. *Gossypium hirsutum* transformation event LL25 PCR analysis Right Border and Left Border terminal repeats. Bayer CropScience N.V. M-216244-01-1.

³² De Beuckeller, M. 2004. *Gossypium hirsutum* elite event LLCotton25 Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services, Nucleic Acid Characterization. Bayer CropScience N.V. M-201049-02-1.

- Digerido con la enzima *EcoRI* (Carril 3), muestra un fragmento de integración de Borde Izquierdo de 7500 pb, el fragmento de integración de Borde Derecho no se puede detectar ya que no hay superposición entre este fragmento y la sonda de ADN-T.
- Digerido con la enzima *AflIII* (Carril 4), muestra el fragmento interno esperado de 1722 pb y dos fragmentos de integración de 3850 pb y 5500 pb, la intensidad de la hibridación de los fragmentos de integración (178 pb y 219 pb) es muy débil debido a la superposición limitada con el de la sonda y debido a la digestión parcial del ADN genómico
- Digerido con la enzima *BglII* (Carril 5), muestra un fragmento interno de 1542 pb y dos fragmentos de integración >10 kb, la intensidad de la hibridación de los fragmentos de integración es muy débil debido a la limitada superposición (321 pb y 387 pb) con la sonda
- Digerido con la enzima *NcoI* (Carril 6), muestra un fragmento interno de 877 pb y un fragmento de integración de Borde Derecho de 4200 pb, el fragmento de integración de Borde Izquierdo no se espera que hibride ya que no hay homología entre este fragmento y la sonda

Figura 14. Esquema del T-DNA del evento LLCotton25 mostrando la estrategia de hibridación.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Los resultados del análisis de hibridación *Southern blot* obtenidos del DNA genómico del algodón LLCotton25 demuestran que el ADN transferido en la planta corresponde a la configuración de ADN como se ha diseñado en el plásmido pGSV71. Los datos obtenidos muestran que una copia de la secuencia del gen se integra en el genoma de *Gossypium hirsutum* LLCotton25. (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)

3. Expresión de RNA mensajero (mRNA).

La tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio en el algodón GHB614 x LLCotton25 es conferida por la función de las nuevas proteínas expresadas por las plantas de algodón. Específicamente, la tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio es conferida por la expresión de las proteínas 2mEPSPS y PAT/*bar*, El mRNA está presente y funciona en la traducción correcta de estas proteínas, de lo contrario, no se observaría su efectividad biológica. Los resultados de los estudios bio-informáticos, *Southern Blot* y PCR realizados en los eventos GHB614 y LLCotton25 demostraron el correcto patrón de integración del T-DNA, la equivalencia de las regiones flanqueantes y el tamaño de las bandas esperadas para cada gen, usando combinaciones de sondas y enzimas de restricción para caracterizar el DNA insertado. Asimismo, se demostró 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.

Numerosos estudios han demostrado que el nivel de mRNA no es un reflejo directo del contenido de proteína en la célula, consecuentemente existe una pobre correlación entre el mRNA y los niveles de expresión de proteínas (Gygi *et al.*, 1999; Pradet-Balade *et al.*, 2001; Greenbaum *et al.*, 2003; Maier *et al.*, 2009; Gedeon & Bokes, 2012). Las razones que influyen



en esta pobre correlación están relacionadas con la gran variedad y complejidad de mecanismos post-transcripcionales involucrados en la traducción de los mRNA en proteínas como corte y empalme, poliadenilación y edición del mRNA; así como la proteólisis o compartimentalización celular (Gupta *et al.*, 2015; Payne, 2015). Los niveles de expresión de proteínas no sólo dependen de las tasas de transcripción de los genes, sino de otros factores tales como la localización del mRNA, la exportación nuclear, los mecanismos de control de la traducción, transcripción y estabilidad de la proteína.

En muchos casos, las transcripciones aún en bajas cantidades, pueden producir las proteínas objetivo, mientras que en otros casos una cantidad abundante de mRNA puede ser funcionalmente inactiva, lo que da como resultado bajos niveles de proteína, por mencionar un ejemplo, en el desarrollo de la hoja de maíz las proporciones proteína/mRNA para un gen específico variaron hasta 10 veces dependiendo de la posición de la célula a lo largo del desarrollo de la hoja, demostrando con eso la importancia del control post-transcripcional (Ponnala *et al.*, 2014). Estos resultados reiteran el hecho de que las proteínas, en lugar de los mRNA, son los elementos clave en las células. Por estas razones, creemos que la determinación de los niveles de mRNA para la transcripción de las nuevas proteínas en los productos de algodón no es necesaria.

El contenido de la célula es dinámico y el mRNA es notoriamente inestable fuera de la célula, haciendo muy difícil su cuantificación. Dentro de la célula la inestabilidad del mRNA es un medio que permite a la planta responder rápidamente a situaciones ambientales (Green, 1993). La vida media del mRNA puede variar de 10 min a 60 min. Muchos transcriptos son estables, pero las proteínas que representan pueden tener diferentes estabilidades relativas o diferentes tasas de descomposición. Los factores adicionales que pueden contribuir a la incapacidad para correlacionar el nivel de proteína y el nivel de mRNA incluyen el uso de codones, la ocupación del ribosoma, la eficiencia de traducción, así como factores intrínsecos dentro de la secuencia del mensaje, genes y proteínas.

En la evaluación de la inocuidad de los cultivos modificados genéticamente, el nivel de la proteína (es decir, el producto del gen) se considera más relevante que el nivel de mRNA a partir del cual se traduce la proteína (Delaney *et al.*, 2008, Cockburn, 2002). Si el mRNA se traduce, a continuación, la proteína es el producto al que están expuestos los humanos, los animales y el medio ambiente. Los ácidos nucleicos (DNA y RNA) están presentes en todas las formas de vida y siempre han estado presentes en la alimentación humana y animal doméstico. Por lo tanto, el DNA y el RNA son considerados por la EPA como exentos de tolerancia (EPA, 2001). La FDA de Estados Unidos clasifica al RNA como GRAS (generalmente considerado como seguro), y el USDA se ha alineado con estas decisiones para resoluciones recientes (FDA, 1992; USDA, 2006; USDA 2011). Como tal, los niveles de expresión de proteínas proporcionan información suficiente para evaluar la seguridad de un cultivo genéticamente modificado en lo que respecta a la exposición. Con relación a la actividad de los transgenes insertados en la planta de algodón GL cuyo fenotipo se basa precisamente en la presencia y actividad de la proteína que codifican (tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio por la expresión de las proteínas 2mEPSPS y PAT/*bar*), los estudios de caracterización incluyen la cuantificación de las proteínas que expresan; de esta manera se establecen los niveles y sitios de expresión, información relevante para el análisis de riesgo.



En concordancia con lo anterior, el análisis para determinar la seguridad del algodón GL, incluyó la cuantificación de proteínas más que un análisis de transcripción de los RNA mensajeros por tres razones:

1. El RNA es un material GRAS (Generally Regarded As Safe, generalmente considerado como seguro).
2. El mRNA generalmente se degrada rápidamente.
3. Los niveles de mRNA frecuentemente no se correlacionan con los niveles de las proteínas codificadas.

Debido a que el algodón GL con los eventos apilados GHB614 x LLCotton25 se obtuvo mediante cruzamiento convencional de eventos independientes, GHB614 y LLCotton25, el inserto de cada una de las secuencias conferidas se encuentra incorporado en un sitio independiente. 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 2mEPSPS y PAT/*bar* fueron determinados mediante la técnica de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) y analizados estadísticamente en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V7, inicio de cuadros y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo con y sin aplicaciones de herbicida, establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos durante el ciclo 2012 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**³³). Los resultados de la determinación del nivel de expresión de las proteínas se presentan en los Cuadros 15 - 18.

Cuadro 15. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	156 ± 98	76.6 – 459	726 ± 310	500 – 1,520
		GHB614 x LLCotton25	124 ± 70	54.3 - 357	641 ± 240	359 – 1,130
	Raíz	GHB614	15.2 ± 3.0	9.01 - 19.6	75.5 ± 25	41.8 - 132
		GHB614 x LLCotton25	13.3 ± 3.9	4.68 - 18.6	976.0 ± 36	20.4 - 149
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	92.8 ± 38	37.8 - 161	457 ± 140	249 - 676
		GHB614 x LLCotton25	84.3 ± 34	30.7 - 136	493 ± 190	251 - 883
	Bellotas inmaduras	GHB614	32.1 ± 19	11.9 - 71.1	199 ± 110	86.5 - 405
		GHB614 x LLCotton25	29.9 ± 20	9.08 - 62.6	221 ± 140	95.5 - 489
Madurez	Semilla con borra	GHB614	99.3 ± 12	80.8 - 128	113 ± 13	96.7 - 143
		GHB614 x LLCotton25	96.0 ± 9.3	81.1 - 114	109 ± 11	93.3 - 127

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y

³³ Jeffries, T. A. 2013. GHB614 x LLCotton25 – Production and Protein Expression Analyses of Field Grown Samples. USA, 2012. Study Number 12-RSXFT009. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC 27709. M-447807-01-1



duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 16. Niveles de expresión de la proteína **2mEPSPS** en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	138 ± 71	60.7 - 300	704 ± 270	339 - 1,230
		GHB614 x LLCotton25	134 ± 85	43.4 - 405	704 ± 290	386 - 1,360
	Raíz	GHB614	15.6 ± 2.9	10.7 - 19.2	86.9 ± 26	59.7 - 133
		GHB614 x LLCotton25	13.9 ± 2.5	9.61 - 17.5	72.8 ± 20	42.1 - 110
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	86.3 ± 29	57.9 - 162	460 ± 140	275 - 679
		GHB614 x LLCotton25	83.8 ± 32	35.6 - 147	488 ± 180	283 - 772
	Bellotas inmaduras	GHB614	24.5 ± 14	10.9 - 49.2	165 ± 66	96.9 - 279
		GHB614 x LLCotton25	25.1 ± 14	10.7 - 50.9	173 ± 38	127 - 241
Madurez	Semilla con borra	GHB614	82.4 ± 16	47.6 - 112	93.0 ± 19	53.6 - 123
		GHB614 x LLCotton25	85.5 ± 13	62.1 - 116	97.1 ± 16	71.6 - 126

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 17. Niveles de expresión de la proteína **LLCotton25** en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	147 ± 40	96.7 - 240	860 ± 100	749 - 1,030
		GHB614 x LLCotton25	136 ± 40	84.2 - 210	727 ± 87	576 - 855
	Raíz	GHB614	46.6 ± 9.3	29.6 - 67.6	232 ± 50	143 - 335
		GHB614 x LLCotton25	40.3 ± 5.2	28.7 - 51.0	222 ± 62	136 - 356
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	172 ± 48	118 - 270	941 ± 160	716 - 1,150
		GHB614 x LLCotton25	182 ± 29	116 - 238	1,090 ± 180	814 - 1,460
	Bellotas inmaduras	GHB614	61.8 ± 37	14.5 - 135	461 ± 290	87.4 - 884
		GHB614 x LLCotton25	86.5 ± 55	26.8 - 184	634 ± 380	296 - 1,380
Madurez	Semilla con borra	GHB614	180 ± 31	130 - 237	204 ± 33	150 - 248
		GHB614 x LLCotton25	179 ± 25	135 - 233	203 ± 27	164 - 256

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).



Cuadro 18. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	144 ± 50	60.8 - 276	775 ± 160	437 - 945
		GHB614 x LLCotton25	144 ± 52	85.5 - 279	788 ± 100	667 - 995
	Raíz	GHB614	41.8 ± 7.0	32.8 - 62.8	224 ± 50	170 - 347
		GHB614 x LLCotton25	40.1 ± 4.7	30.1 - 48.3	209 ± 47	158 - 302
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	156 ± 67	62.4 - 275	884 ± 400	360 - 1,490
		GHB614 x LLCotton25	149 ± 60	63.4 - 263	921 ± 450	322 - 1,620
	Bellotas inmaduras	GHB614	54.9 ± 25	15.5 - 97.4	407 ± 160	127 - 645
		GHB614 x LLCotton25	58.1 ± 22	31.4 - 113	435 ± 110	242 - 600
Madurez	Semilla con borra	GHB614	157 ± 24	97.2 - 221	178 ± 26	131 - 234
		GHB614 x LLCotton25	162 ± 22	130 - 205	183 ± 22	153 - 224

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

I.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**³⁴).

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 15 - 16**):

³⁴ Lecleir, M. 2007. Description of vector pTEM2. Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. M-237715-02-1.



- 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 estreptomicina y espectinomicina, 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 19](#).

[Figura 15](#). Mapa del vector pTEM2.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Figura 16](#). Diagrama del T-DNA del plásmido pTDL008.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Cuadro 19](#). Tamaño, origen y función prevista de los elementos genéticos presentes en la región T-DNA del vector pTEM2.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

1.2. Evento LLCotton25.

Para la transformación de plantas, se utiliza el sistema de vector tal como se describe por Deblaere *et al.* (1985, 1987), este sistema consiste en una cepa de *Agrobacterium* y dos componentes de plásmidos¹) un no-oncogénico Ti-plásmido y 2) un vector de clonación intermedio pGSV1. El Ti-plásmido no oncogénico a partir del cual se ha suprimido la región T lleva los genes *vir* necesarios para la transferencia de un T-DNA artificial clonado en el segundo plásmido al genoma de la planta. En este vector intermedio, se introducen los genes de interés entre las secuencias bordes del T-DNA de 25 pb.

El plásmido Ti no-oncogénico, pGV2260 se deriva del plásmido Ti la octopina pTiB6S3 (Deblaere *et al.*, 1985). La región T de pTiB6S3 ha sido sustituida por secuencias de pBR322. El plásmido Ti no-oncogénico pGV3000 se ha derivado de pGV2260 introduciendo el gen de



resistencia a kanamicina dentro de la región de codificación del gen de resistencia a ampicilina (*bla*) dando como resultado la inactivación del gen *bla*.

El vector intermedio pGSV1 esencialmente se ha derivado de pGSC1700 (Cornelissen y Vandewiele, 1989). El vector intermedio pGSV1 comprende los siguientes elementos estructurales:

- El plásmido núcleo que comprende el origen de replicación del plásmido pBR322 (Bolivar et al., 1977) para la replicación en *Escherichia coli* (pBRori) y un fragmento de restricción que comprende el origen de replicación del plásmido de *Pseudomonas* pVS1 (Itoh et al., 1984) para la replicación en *Agrobacterium tumefaciens* (pVSIori);
- Un gen marcador de selección que confiere resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina (Sm/Sp) para la propagación y selección del plásmido en *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*;
- Una región T artificial que consiste de las secuencias de borde izquierdo y derecho de la TL-DNA de pTiB6S3 y sitios de clonación *multilinker* que permite la inserción de genes quiméricos entre las repeticiones de los bordes de T-DNA.

El plásmido **pGSV71** esencialmente se ha derivado de pGSV1. El plásmido pGSV71 se utilizó para conferir tolerancia al glufosinato. La estructura del vector del plásmido, así como la representación esquemática de la organización de los genes quiméricos entre el borde del T-DNA se muestra en la [Figura 17](#). Una descripción completa del ADN comprendido entre las repeticiones fronterizas de pGSV71 se da en el [cuadro 20](#). (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**³⁵)

[Figura 17](#). Mapa del vector pGSV71.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

El plásmido pGSV71 lleva un gen quimérico que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Este gen quimérico se denota como p35S-*bar*-3'nos. El constructo de gen *bar* quimérico contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al., 1985). La secuencia codificante *bar* (Thompson et al., 1987) es seguida por la región 3'no-traducida del gen de la nopalina sintasa del T-DNA de pTiT37 (Depicker et al., 1982).

[Cuadro 20](#). Elementos genéticos del vector pGSV71 que fueron insertados en el genoma de la planta.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

³⁵ Reynaerts, A. 1999. Description of vector pGSV71 (*Gossypium hirsutum*). Plant Genetic Systems NV. M-188295-01-1.



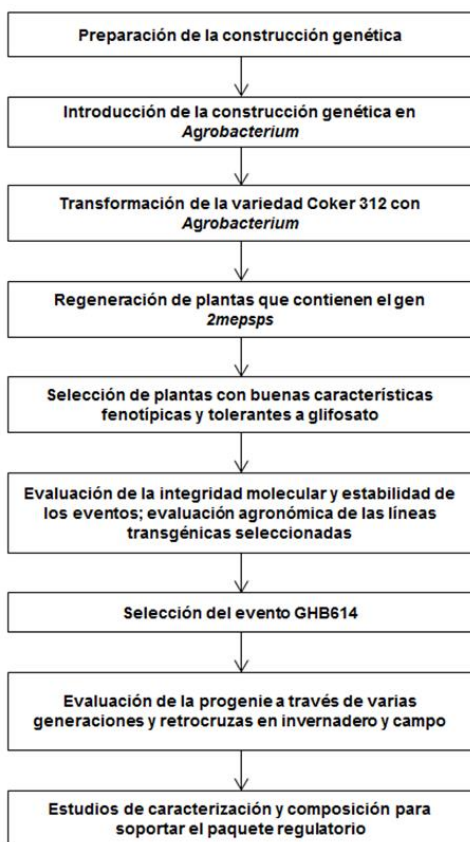
2. Tipo de herencia de los caracteres.

El estudio de estabilidad molecular mediante PCR y el análisis de los datos de segregación, permitieron concluir que los eventos GHB614 y LLCotton25 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 18).

Figura 18. Diagrama del desarrollo del evento GHB614.

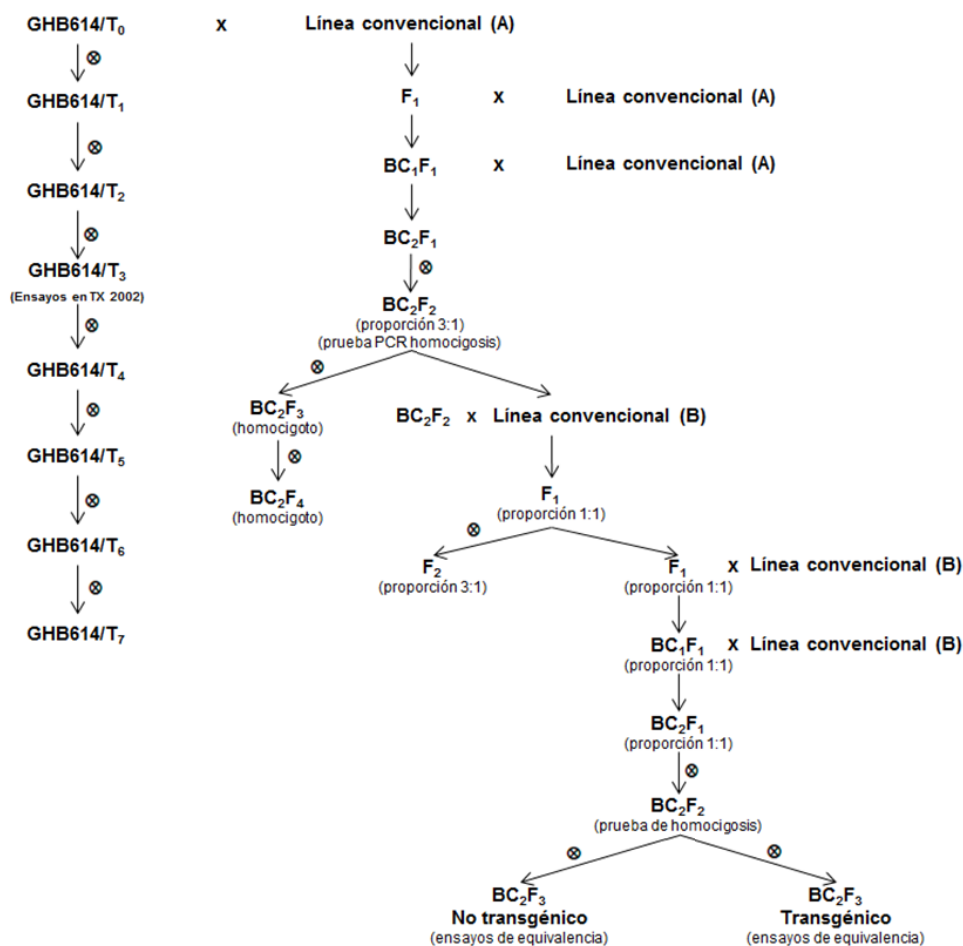




Durante el desarrollo del algodón GHB614 el *locus* transgénico fue introgresado en variedades seleccionadas de algodón. Asimismo, se realizaron pruebas de tolerancia al herbicida glifosato bajo condiciones de invernadero a la dosis comercial 1X. Las plantas fueron evaluadas como tolerantes (vivas, sin 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 19). 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 21). En resumen, todos los datos y análisis realizados indican que el evento GHB614 se comporta como un alelo simple en un *locus* único.

Figura 19. Diagrama del desarrollo del algodón GHB614.





Notas:

- En cada generación, las plantas de algodón fueron asperjadas con glifosato para eliminar las que no expresaban el gen *2mepsps*.
- ⊗ = autocruzamiento.
- Las plantas homocigóticas T₃ se identificaron plantando 25 semillas y asperjándolas con glifosato para identificar los lotes de semilla segregantes. También se realizó el análisis Invader® de homocigosidad basado en PCR, como segundo método para identificar las plantas homocigóticas.
- La semilla homocigótica T₃ autopolinizada (sin segregación para resistencia) 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.
- La generación BC₂F₄ (homocigótica) se utilizó para la caracterización detallada del inserto y los niveles de expresión de proteína/RNA.
- Las generaciones T₃, T₄, T₅, T₆ y BC₂F₂ se utilizaron para análisis de estabilidad molecular.
- La generación T₅ se utilizó para realizar el análisis de composición de las semillas.
- Las generaciones T₅ y BC₂F₃ se utilizaron para ensayos agronómicos en campo.
- La generación T₇ se utilizó para análisis sobre la ausencia/presencia de secuencias del esqueleto del vector (*vector backbone*).

Cuadro 21. Análisis de segregación del evento GHB614.

Progenitores y cigocidad para el locus <i>2mepsps</i>	Generación	Proporción R:S	Observado		Esperado		χ^2 calculada ^a
			R	S	R	S	
Planta hemicigota BC ₂ F ₁ (línea A convencional), auto-polinizada (<i>2mepsps</i> /-) x (<i>2mepsps</i> /-)	BC ₂ F ₂	3:1	28 ^b	8	27	9	0.15
Planta hemicigota BC ₂ F ₂ cruzada con la línea convencional B (<i>2mepsps</i> /-) x (-/-)	Población F ₁ ^c	1:1	7	9	8	8	0.25
Planta hemicigota auto-polinizada F ₁ (<i>2mepsps</i> /-) x (<i>2mepsps</i> /-)	Poblaciones F ₂ (agrupadas)	3:1	113	43	117	39	0.60
Planta hemicigota F ₁ cruzada con la línea convencional B (<i>2mepsps</i> /-) x (-/-)	Población BC ₁ F ₁	1:1	9	12	10.5	10.5	0.43
Planta hemicigota BC ₁ F ₁ cruzada con la línea convencional B (<i>2mepsps</i> /-) x (-/-)	BC ₂ F ₁	1:1	11	6	8.5	8.5	1.47

^a Asume un modelo de un locus. No hubo diferencia significativa ($p=0.05$) para la prueba de bondad de ajuste χ^2 para la hipótesis de un locus. Para rechazar la hipótesis nula, el valor de la χ^2 debe ser mayor que 3.84 con un grado de libertad.

^b Homocigosidad probada por medio de PCR (19 plantas heterocigotas y 9 plantas homocigotas).

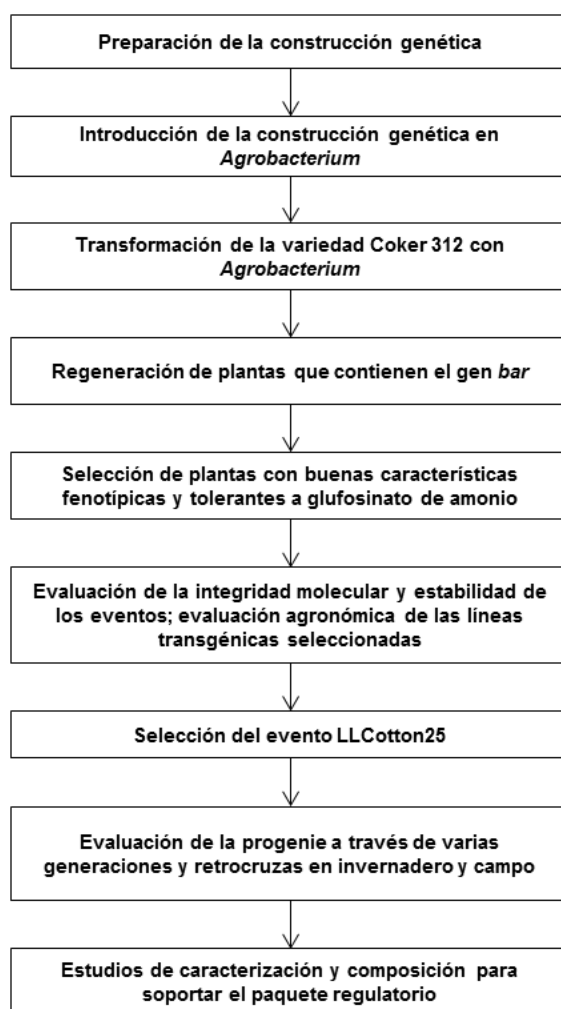
^c Todo el material de la población F₁ fue generado usando una planta hemicigota como fuente donadora (BC₂F₁).

S = susceptible; R = resistente.

2.2. Evento LLCotton25.

El algodón LLCotton25 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 glufosinato de amonio, fue sembrada en invernadero para incremento de semilla y evaluación. Las plantas T₁ fueron seleccionadas por su tolerancia al glufosinato y en cada generación, las plantas de algodón fueron asperjadas con glufosinato para eliminar las que no expresaban el gen *bar*. Las plantas homocigóticas T₃ se identificaron plantando 25 semillas y asperjándolas con glufosinato 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 20).

Figura 20. Diagrama del desarrollo del evento LLCotton25.



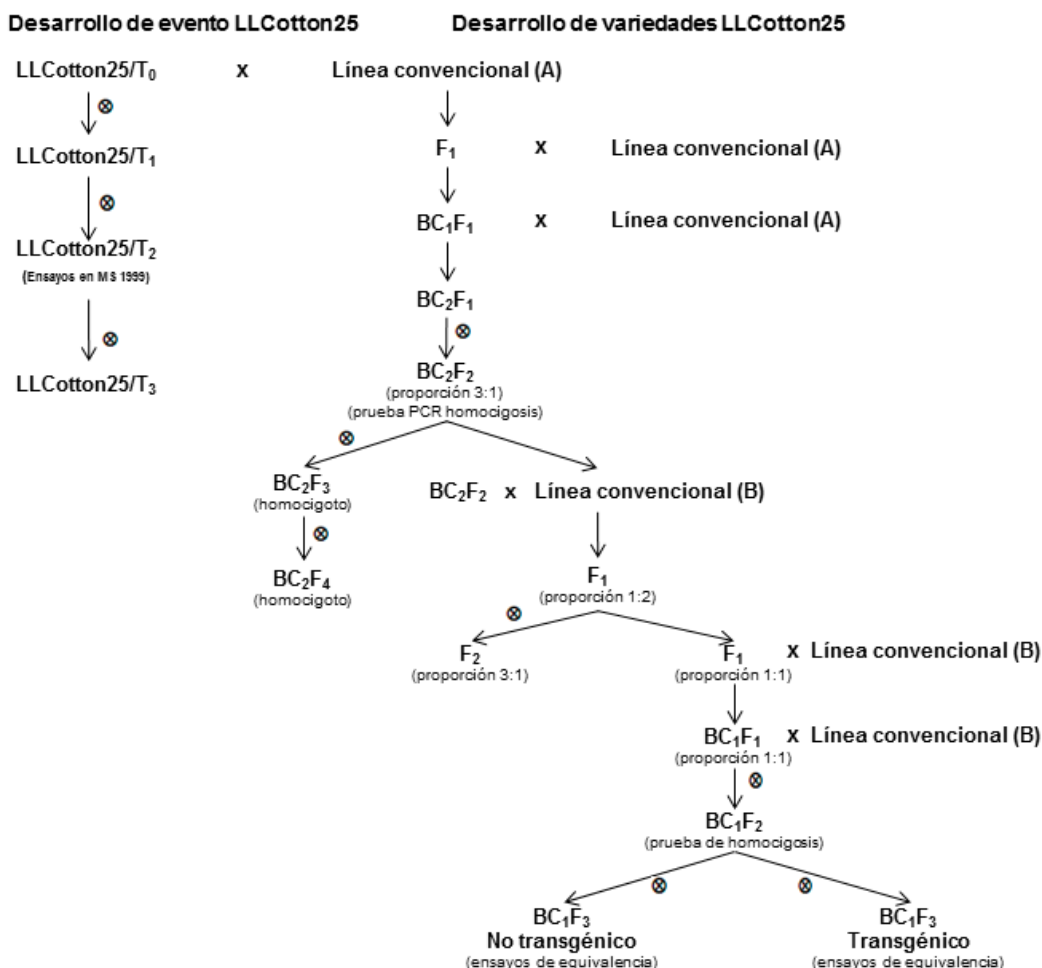


Durante el desarrollo del algodón LLCotton25 el *locus* transgénico fue introgresado en variedades seleccionadas de algodón. Asimismo, se realizaron pruebas de tolerancia al herbicida glufosinato de amonio bajo condiciones de invernadero a la dosis 2% en agua. Las plantas fueron evaluadas como tolerantes (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 LLCotton25 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 21). El material BC₁F₁ 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 BC₁F₁. Adicionalmente, la progenie BC₁F₂ debería producir 3 plantas resistentes por cada planta susceptible (Cuadro 22

Cuadro 21). En resumen, todos los datos y análisis realizados indican que el evento LLCotton25 se comporta como un alelo simple en un *locus* único.

Figura 21. Diagrama del desarrollo del algodón LLCotton25.



Cuadro 22. Análisis de segregación del Evento de Transformación LLCotton25.

Progenitores y cigocidad del locus <i>bar</i>	Generación	Tasa R:S	Observado		Esperado		Valores de χ cuadrada	
			R	S	R	S	Calc. 1	p =0.05, 1df
Autopolinizado plantas hemicigotas T1 [(<i>bar</i> -) x (<i>bar</i> -)]	Individual T2 plants ²	3:1	2959	957	2937	979	0.66	3.84
Autopolinizado plantas hemicigotas T1 [(<i>bar</i> -) x (<i>bar</i> -)]	T2 boll rows ³	1:2	89	145	78	156	2.33	3.84
Hemicigoto T0, o T1 cruzadas con progenitor rec. elite [(<i>bar</i> -) x (-)]	F1 ⁴	1:1	659	597	628	628	3.06	3.84
1ª retrocruza de plantas F1 con progenitores rec. [(<i>bar</i> -) x (-)]	BC1 ⁴	1:1	166	172	169	169	0.11	3.84
1ª autopolinización de hemicigoto BC1 [(<i>bar</i> -) x (<i>bar</i> -)]	BC1F2 ⁴	3:1	824	270	820	274	0.08	3.84

1. Se asume el modelo de un locus. No existió diferencia significativa (p=0.05) para la prueba χ cuadrada para la hipótesis de un locus. Para rechazar la hipótesis nula, el valor de χ cuadrada debe ser mayor que 3.84, con un grado de libertad;

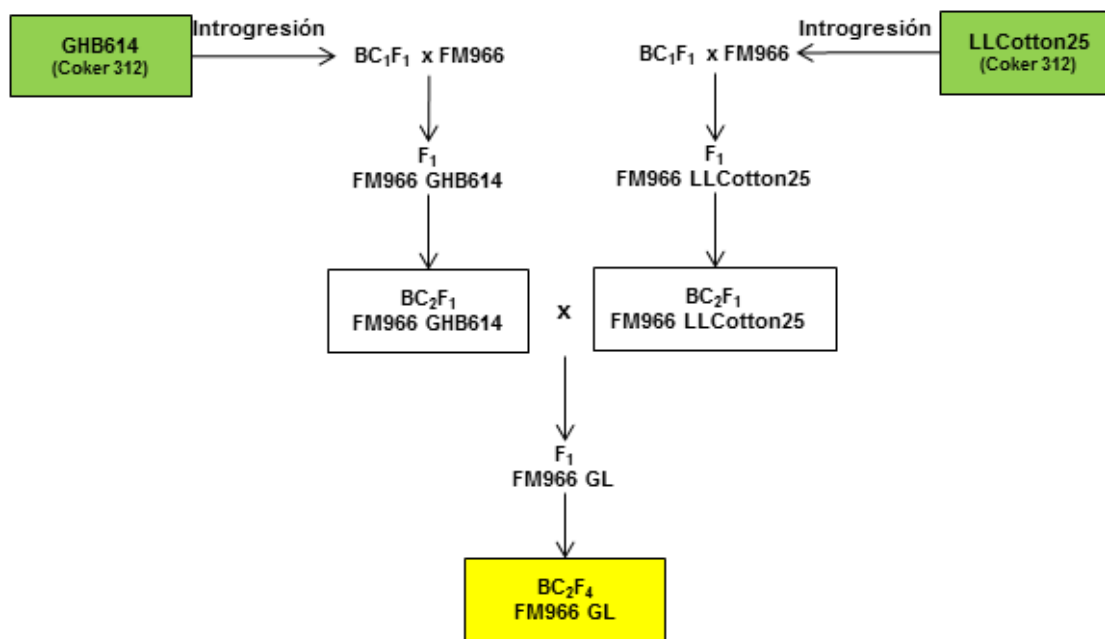
2. Cada planta contó en cada hilera, la información se juntó para este análisis;

3. La segregación de hileras de bellotas totalmente resistentes contra parcialmente resistentes T2 derivadas de plantas resistentes T1. Hileras de bellotas homocigotas (no segregación para resistencia) fueron la fuente de las líneas que fueron usadas en estudios de estabilidad de evento agronómico temprano; y
4. La información agregada a través de antecedentes genéticos (no efecto evidente de antecedentes).
S=susceptible; R=resistente T1= hemicigoto (bar/-), progenies de autopolinización T0 plantas sobrevivientes del tratamiento con Liberty (la cigocidad fue confirmada mediante pruebas subsecuentes de progenie T2, T0= transformantes primarios de Coker 312, progenitores rec. = germoplasma elite recurrente.

2.3. Algodón GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25).

El algodón GHB614 x LLCotton25 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25 como se ilustra en la [figura 22](#). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

Figura 22. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x LLCotton25.



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 2mEPSPS y PAT/bar fueron determinados mediante la técnica de ensayo por inmunabsorción ligado a enzima (ELISA) y analizados estadísticamente en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V7, inicio de cuadros y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo con y sin aplicaciones de herbicida, establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados



Unidos durante el ciclo 2012 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**³⁶). Los resultados de la determinación del nivel de expresión de las proteínas se presentan en los Cuadros 23 - 26.

Cuadro 23. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	156 ± 98	76.6 – 459	726 ± 310	500 – 1,520
		GHB614 x LLCotton25	124 ± 70	54.3 - 357	641 ± 240	359 – 1,130
	Raíz	GHB614	15.2 ± 3.0	9.01 - 19.6	75.5 ± 25	41.8 - 132
		GHB614 x LLCotton25	13.3 ± 3.9	4.68 - 18.6	9 76.0 ± 36	20.4 - 149
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	92.8 ± 38	37.8 - 161	457 ± 140	249 - 676
		GHB614 x LLCotton25	84.3 ± 34	30.7 - 136	493 ± 190	251 - 883
	Bellotas inmaduras	GHB614	32.1 ± 19	11.9 - 71.1	199 ± 110	86.5 - 405
		GHB614 x LLCotton25	29.9 ± 20	9.08 - 62.6	221 ± 140	95.5 - 489
Madurez	Semilla con borra	GHB614	99.3 ± 12	80.8 - 128	113 ± 13	96.7 - 143
		GHB614 x LLCotton25	96.0 ± 9.3	81.1 - 114	109 ± 11	93.3 - 127

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 24. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	138 ± 71	60.7 - 300	704 ± 270	339 - 1,230
		GHB614 x LLCotton25	134 ± 85	43.4 - 405	704 ± 290	386 - 1,360
	Raíz	GHB614	15.6 ± 2.9	10.7 - 19.2	86.9 ± 26	59.7 - 133
		GHB614 x LLCotton25	13.9 ± 2.5	9.61 - 17.5	72.8 ± 20	42.1 - 110
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	86.3 ± 29	57.9 - 162	460 ± 140	275 - 679
		GHB614 x LLCotton25	83.8 ± 32	35.6 - 147	488 ± 180	283 - 772
	Bellotas inmaduras	GHB614	24.5 ± 14	10.9 - 49.2	165 ± 66	96.9 - 279
		GHB614 x LLCotton25	25.1 ± 14	10.7 - 50.9	173 ± 38	127 - 241
Madurez	Semilla	GHB614	82.4 ± 16	47.6 - 112	93.0 ± 19	53.6 - 123

³⁶ Jeffries, T. A. 2013. GHB614 x LLCotton25 – Production and Protein Expression Analyses of Field Grown Samples. USA, 2012. Study Number 12-RSXFT009. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC 27709. M-447807-01-1



Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
	con borra	GHB614 x LLCotton25	85.5 ± 13	62.1 - 116	97.1 ± 16	71.6 - 126

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 25. Niveles de expresión de la proteína **LLCotton25** en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	147 ± 40	96.7 - 240	860 ± 100	749 - 1,030
		GHB614 x LLCotton25	136 ± 40	84.2 - 210	727 ± 87	576 - 855
	Raíz	GHB614	46.6 ± 9.3	29.6 - 67.6	232 ± 50	143 - 335
		GHB614 x LLCotton25	40.3 ± 5.2	28.7 - 51.0	222 ± 62	136 - 356
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	172 ± 48	118 - 270	941 ± 160	716 - 1,150
		GHB614 x LLCotton25	182 ± 29	116 - 238	1,090 ± 180	814 - 1,460
	Bellotas inmaduras	GHB614	61.8 ± 37	14.5 - 135	461 ± 290	87.4 - 884
		GHB614 x LLCotton25	86.5 ± 55	26.8 - 184	634 ± 380	296 - 1,380
Madurez	Semilla con borra	GHB614	180 ± 31	130 - 237	204 ± 33	150 - 248
		GHB614 x LLCotton25	179 ± 25	135 - 233	203 ± 27	164 - 256

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 26. Niveles de expresión de la proteína **LLCotton25** en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	144 ± 50	60.8 - 276	775 ± 160	437 - 945
		GHB614 x LLCotton25	144 ± 52	85.5 - 279	788 ± 100	667 - 995
	Raíz	GHB614	41.8 ± 7.0	32.8 - 62.8	224 ± 50	170 - 347
		GHB614 x LLCotton25	40.1 ± 4.7	30.1 - 48.3	209 ± 47	158 - 302
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	156 ± 67	62.4 - 275	884 ± 400	360 - 1,490
		GHB614 x LLCotton25	149 ± 60	63.4 - 263	921 ± 450	322 - 1,620
	Bellotas inmaduras	GHB614	54.9 ± 25	15.5 - 97.4	407 ± 160	127 - 645
		GHB614 x LLCotton25	58.1 ± 22	31.4 - 113	435 ± 110	242 - 600



Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
Madurez	Semilla con borra	GHB614	157 ± 24	97.2 - 221	178 ± 26	131 - 234
		GHB614 x LLCotton25	162 ± 22	130 - 205	183 ± 22	153 - 224

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

I.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 explantes 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, 2008³⁷). 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

³⁷ Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). 2008. Final assessment report. Application A614. Food derived from glyphosate-tolerant cotton line GHB614.



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 LLCotton25.

El algodón Libertad Link® fue producido por la transformación mediada por *Agrobacterium* (Zambryski 1992) utilizando la variedad de algodón Coker 312 y el evento de transformación LLCotton25. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria gram-negativa común del suelo que causa la enfermedad de agalla en una amplia variedad de plantas. En el uso de vectores de *Agrobacterium* se transfiere sólo el T-ADN y se integra en el genoma de la planta (Chilton et al 1977;.. Zupan et al 2000), aunque las secuencias del vector que flanquean los extremos también se pueden transferir. En general la transferencia de T-ADN en células vegetales por *Agrobacterium* es irreversible (Huttner et al. 1992) y no se puede volver a movilizar y transferir en otras partes del genoma o a otros organismos. La transformación mediada por *Agrobacterium* se ha usado ampliamente para la introducción de genes en las plantas sin causar preocupaciones de bioseguridad o reacciones adversas.

Cepas de *Agrobacterium* desacopladas se han construido específicamente para la transformación de plantas. Las cepas desacopladas no contienen los genes responsables de la sobreproducción de auxina y citocinina (iaaM, iaaH y ipt), que son necesarios para la inducción de tumores y el crecimiento rápido de callos (Klee y Rogers 1989). Los vectores de los plásmidos de *Agrobacterium* utilizados para la transferencia de T-ADN, contienen segmentos de ADN bien caracterizados necesarios para su replicación y selección en bacterias, y para la transferencia del T-ADN de *Agrobacterium* y su integración en el genoma de la célula de la planta (Bevan 1984; Wang et al 1984). En este caso, se utilizó el plásmido pGSV71 de vector binario (Berghman 2003) para introducir el gen *bar* en la variedad Coker 312. Este plásmido es un derivado del plásmido pGSC1700 (Cornelissen y Vandewiele, 1989). Los elementos genéticos de pGSV71 que fueron transferidos en el genoma vegetal se describen en la sección l.j.

El plásmido pGSV71 también lleva una copia del gen marcador de selección *aadA* del transposón bacteriano Tn7 (de *Escherichia coli*), que confiere resistencia a los antibióticos estreptomycinina y espectinomycinina, para la propagación y selección del plásmido en bacterias y *A. tumefaciens*. Sin embargo, este gen marcador no se transfiere al genoma de las plantas de algodón LibertyLink® (FSANZ, 2008³⁸).

El vector de plásmido pGSV71 se mantuvo en *Escherichia coli*, y se transfiere a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* antes de insertar la transformación. Después de co-cultivo con *A. tumefaciens*, las células de algodón se cultivaron en presencia de fosfinotricina (un análogo de glufosinato de amonio), para seleccionar las que contienen el gen *bar* insertado (ya que el gen *bar* confiere tolerancia a la fosfinotricina). Posteriormente, las plantas de algodón transgénicas que contienen el gen *bar* se regeneraron a partir de estas células y se realizaron ensayos para la tolerancia a herbicidas. Se seleccionó el evento de transformación LLCotton25. Esta línea

³⁸ Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). 2008. Final assessment report. Application A614. Food derived from glyphosate-tolerant cotton line GHB614.



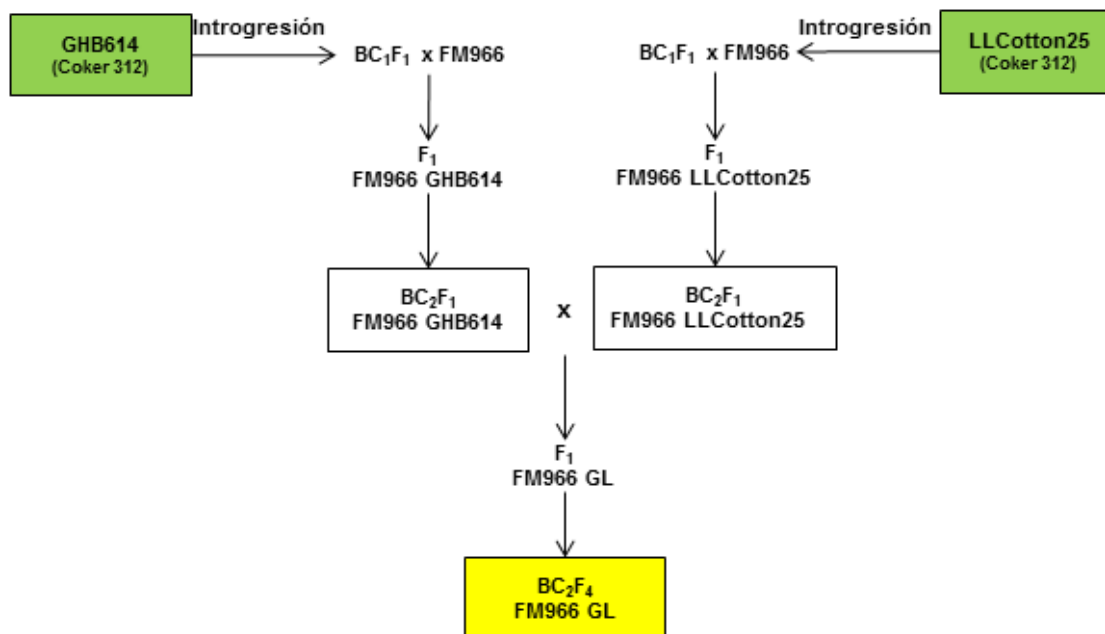
contenía una sola copia del gen *bar*, y mostró, tolerancia a los herbicidas de manera consistente y eficiente tanto en el laboratorio, así como durante las pruebas de campo en los EE.UU.

Las variedades de algodón transgénicos propuestos para la liberación (conocidas como algodón LibertyLink®) son la progenie de retro cruzamiento del algodón transgénico que contiene el evento de transformación LLCotton25 y un número de variedades de algodón convencionales que son adecuados para las zonas de producción de algodón de la región solicitada.

3. Algodón GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25).

El algodón GHB614 x LLCotton25 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25 como se ilustra en la [figura 23](#). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

Figura 23. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x LLCotton25.





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

Los análisis bio-informáticos, *Southern Blot* y PCR realizados en los eventos GHB614 y LLCotton25 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.

1.1. Doble apilado (GHB614 x LLCotton25).

El algodón GL fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614 y LLCotton25. El evento GHB614 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína 2mEPSPS derivada del maíz (*Zea mays* L.). El evento LLCotton25 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de la proteína PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La combinación de estos eventos en el algodón GL provee tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.

Los resultados de los estudios *Southern blot*, bio-informáticos y PCR realizados en los eventos GHB614 y LLCotton25 demostraron el correcto patrón de integración del T-DNA, la equivalencia de las regiones flanqueantes y el tamaño de las bandas esperadas para cada gen, usando combinaciones de sondas y enzimas de restricción para caracterizar el DNA insertado. Asimismo, se demostró 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.

El análisis *Southern blot* del *locus* transgénico de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GL. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente (Habex & Leclair, 2014³⁹; De Beuckeleer, 2004⁴⁰) y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GL. Como era de esperarse, en el evento apilado se presentaron las bandas específicas de cada uno de los eventos. Con base en los resultados del análisis *Southern blot*, se confirmó que el producto apilado GL contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**⁴¹).

³⁹ Habex, V.; Leclair, M. 2014. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. Innovation Center. Belgium. M-279390-05-1.

⁴⁰ De Beuckeleer, M. 2004. *Gossypium hirsutum* elite event LLCotton25. Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services. Belgium. M-201049-02-1.

⁴¹ Currier, T. 2008. Structural stability analysis of cotton event GlyTolxLL. Study Number BK08Q002. Molecular & Biochemical Analytical Services. Research Triangle Park, NC 27709. M-31042901-1.



2. Evento GHB614.

2.1. 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.*, 2006⁴²). 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 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.

2.3. 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.

2.4. 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

⁴²Scott, 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.



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**⁴³).

- *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 24](#) se presenta un esquema de los fragmentos de restricción y la posición de las sondas utilizadas. Asimismo, en el [cuadro 27](#) se presentan los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación.

[Figura 24](#). Esquema del vector pTEM2 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

[Cuadro 27](#). 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 25](#)).

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 26](#)).

⁴³ Habex, V. 2014. Confirmation of the absence/presence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. M-266927-04-1.



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 27Figura 27).

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 28Figura 28).

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 29).

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 25. 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 26. 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 27. 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 28. 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 29. Análisis *Southern blot* del algodón GHB614 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sondas PT005 y T-DNA (PT006).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2.5. 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**⁴⁴).

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).

⁴⁴ Habex, V.; Leclair, M. 2006. Demonstration of the nature of the flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. M-279393-01-1.



3. Evento LLCotton25.

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

El DNA genómico aislado del algodón LLCotton25 y de la variedad convencional Coker 312 fue sometido a análisis *Southern blot*, el ADN genómico de LLCotton25 fue digerido con diferentes enzimas de restricción, los fragmentos se hibridaron de la secuencia completa de T-DNA demuestran que el ADN transferido en la planta corresponde a la configuración de ADN como se ha diseñado en el plásmido pGSV71. Los datos obtenidos muestran que una copia de la secuencia del gen se integra en el genoma de *Gossypium hirsutum* LLCotton25⁴⁵. 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**.

3.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.

Para demostrar la estabilidad del evento LLCotton25, 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 *NcoI* que tiene dos sitios de reconocimiento en pGSV71: uno en la posición 1634 y uno en la posición 2509. La hibridación de ADN genómico LL25 digerido con *NcoI* 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 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 dominante⁴⁶.

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

El gen de interés *bar* también fue utilizado como gen marcador y, por lo tanto, no se utilizó ningún otro gen marcador adicional. El evento LLCotton25 no contiene secuencias del esqueleto del plásmido, lo cual se evidenció utilizando sondas cubriendo la secuencia completa del esqueleto del vector pGSV71 (incluyendo los elementos *aadA*, *5'pVS1ori*, *3'pVS1ori* y *ColE1*). Tampoco se transfirió ningún origen de replicación bacteriano con el sistema de transformación *Agrobacterium* al genoma del algodón como resultado de la transformación.

2.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.

La verificación molecular de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector pGSV71 en el algodón LLCotton25 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.

⁴⁵ De Beuckeleer, M. 2004. *Gossypium hirsutum* elite event LLCotton25 Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services Belgium. M-201049-02-1

⁴⁶ Aerts, M. 2015. Molecular demonstration of the stability of *Gossypium hirsutum* transformation event LL25 in different backgrounds and over different generations. Bayer CropScience N.V.- Innovation Center. M-208142-02-1



Después de la hibridación, las membranas fueron separadas de las sondas del esqueleto del vector y re-hibridadas con la sonda del T-DNA para demostrar que se cargó suficiente DNA genómico del algodón LLCotton25 en los geles. Las muestras de los controles positivos mostraron los fragmentos de hibridación esperados de 9556 pb. No se detectaron fragmentos de hibridación en los carriles correspondientes a las muestras de algodón convencional Coker 312 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**⁴⁷).

*Af*III corta una vez en la secuencia insertada del algodón LLCotton25, por lo tanto, se esperan dos fragmentos de integración después de la hibridación del DNA genómico del algodón LLCotton25 digerido con *Af*III, con la secuencia del T-DNA. El fragmento de integración 5' debe ser mayor de 471 bp y el fragmento de integración 3' debe ser mayor de 2500 bp. El DNA genómico del algodón LLCotton25 digerido con *Af*III muestra tres fragmentos de integración: 2364 bp, 1787 pb y 887 bp. En la [figura 30](#) se presenta un esquema de los fragmentos de restricción y la posición de las sondas utilizadas.

[Figura 30](#). Esquema del vector pGSV71 con indicación de los sitios de restricción relevantes y la posición de las sondas utilizadas.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Sonda *aadA*

En el DNA del control positivo, se observó el fragmento esperado *Af*III de 2364 bp. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón LL25 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 (control negativo) ([Figura 31](#)).

Sonda 5'pVS1ori

En el DNA del control positivo digerido con *Af*III se observó los fragmentos esperados de 2364 pb, 1787 pb y 887 pb. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón LL25 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 ([Figura 32](#)).

Sonda 3'pVS1ori

El control positivo pGSV71 – *Af*III mostró los fragmentos esperados de 1787 pb, 728 pb y 708 pb. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón LL25 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 ([Figura 33](#)).

Sonda *ColE1*

En el DNA del control positivo de LL25 digerido con *Af*III, se observó los fragmentos esperados de 1229 pb y 708 pb. No se observaron señales de hibridación en las muestras de algodón LL25 ni en el DNA del algodón convencional Coker 312 ([Figura 34](#)).

⁴⁷ Habex, V. 2015. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event LL25. Bayer CropScience N.V.- Innovation Center. Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. M-207086-02-1.



Los resultados del análisis *Southern blot* utilizando sondas que cubren la secuencia completa del esqueleto del vector pGSV71, demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto del vector en el algodón LLCotton25.

Figura 31. Análisis *Southern blot* del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda *aadA*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 32. Análisis *Southern blot* del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda *5'pVS1ori*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 33. Análisis *Southern blot* del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda *3'pVS1ori*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 34. Análisis *Southern blot* del algodón LLCotton25 – Comprobación de la ausencia de secuencias del esqueleto del vector – Sonda *ColE1*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

I.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 35). En el **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**⁴⁸ se presenta la caracterización detallada de la proteína 2mEPSPS.

⁴⁸ van der Klis, R.; Hendrickx, K.; Herouet-Guicheney, C.; Rouan, D. 2006. The double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene product 2mEPSPS Description and Characterization. Bayer BioScience N.V. Belgium. M-277049-01-1.



Figura 35. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2. Proteína PAT.

El evento LLCotton25 produce la proteína phosphinothricin acetyl transferase (PAT/*bar*), codificada por el gen *bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (Murakami et al., 1986; Thompson et al., 1987), esta proteína confiere resistencia a la actividad fitotóxica de glufosinato de amonio. Un sitio NcoI se creó en el codón de iniciación. En consecuencia, el segundo codón del gen *bar* - AGC (Ser) se ha modificado para un codón GAC (Asp) (Botterman et al. 1991). La proteína PAT madura de ~21 kDa está constituida por 183 aminoácidos (Figura 36).

Figura 36. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína PAT codificada por el gen *bar* de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

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

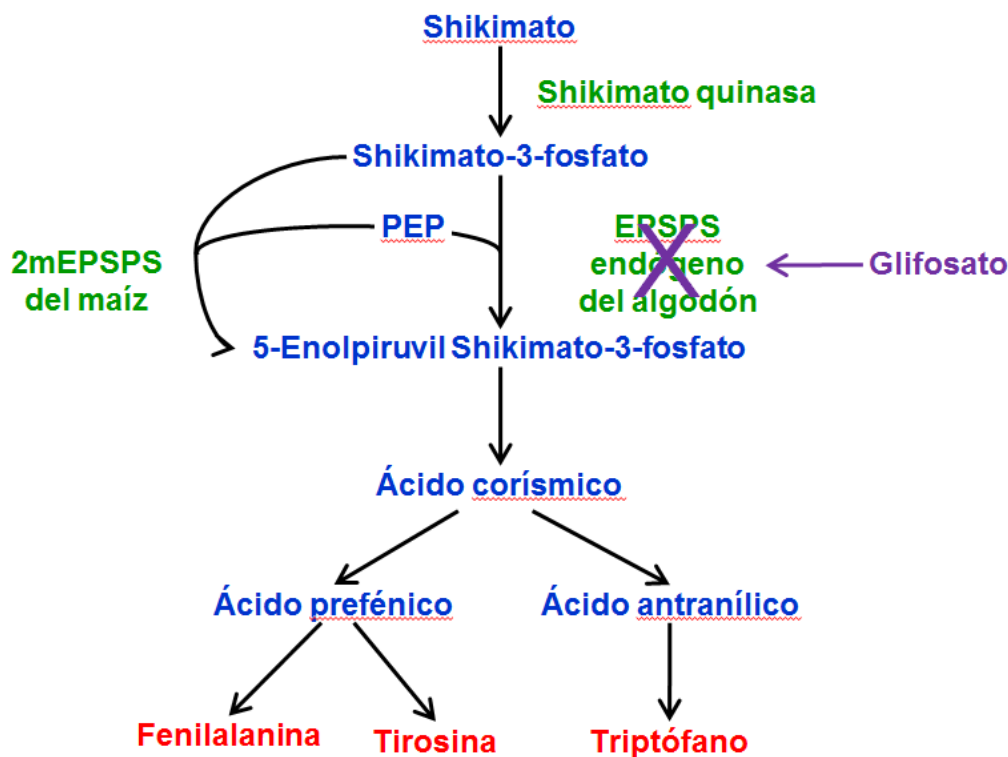
1. Proteína 2mEPSPS.

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 37).

Figura 37. 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. Proteína PAT/*bar*.

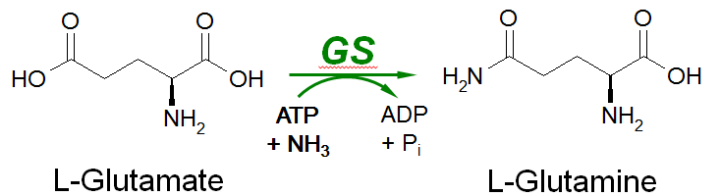
El algodón GHB614 x LLCotton25 contiene el cassette de expresión *bar* que, cuando se transcribe, origina la proteína PAT de ~21 kDa que consiste de un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La secuencia del gen *bar* proviene de *Streptomyces hygroscopicus* y codifica la proteína fosfinotricina N-acetil transferasa (PAT) (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT en el algodón GHB614 x LLCotton25 confiere tolerancia a glufosinato de amonio.

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 38).

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).

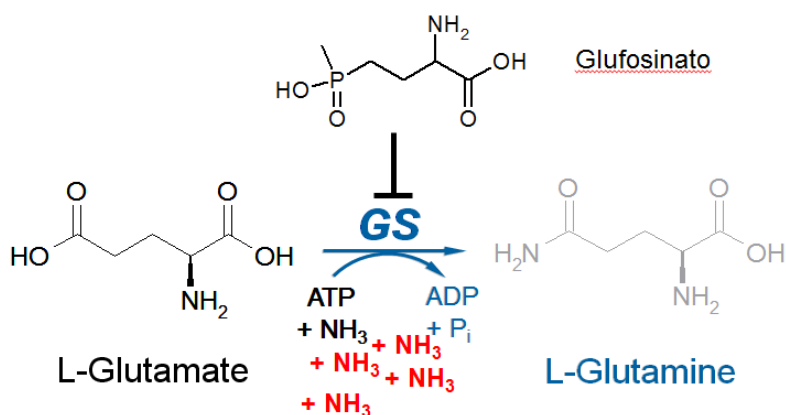
Figura 38. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.

a) Asimilación del amoníaco.



GS: Glutamine synthase

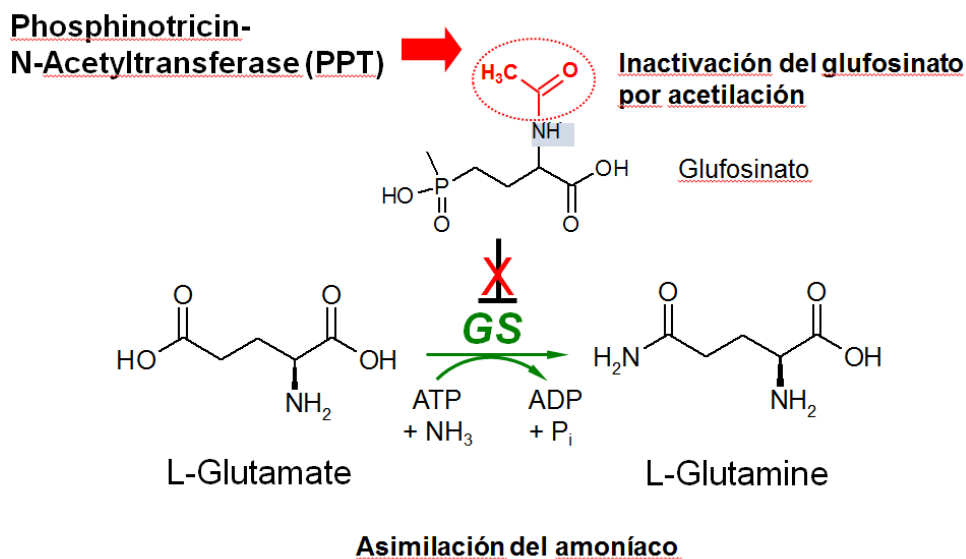
b) Inhibición de la enzima GS.



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 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 39. 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.

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

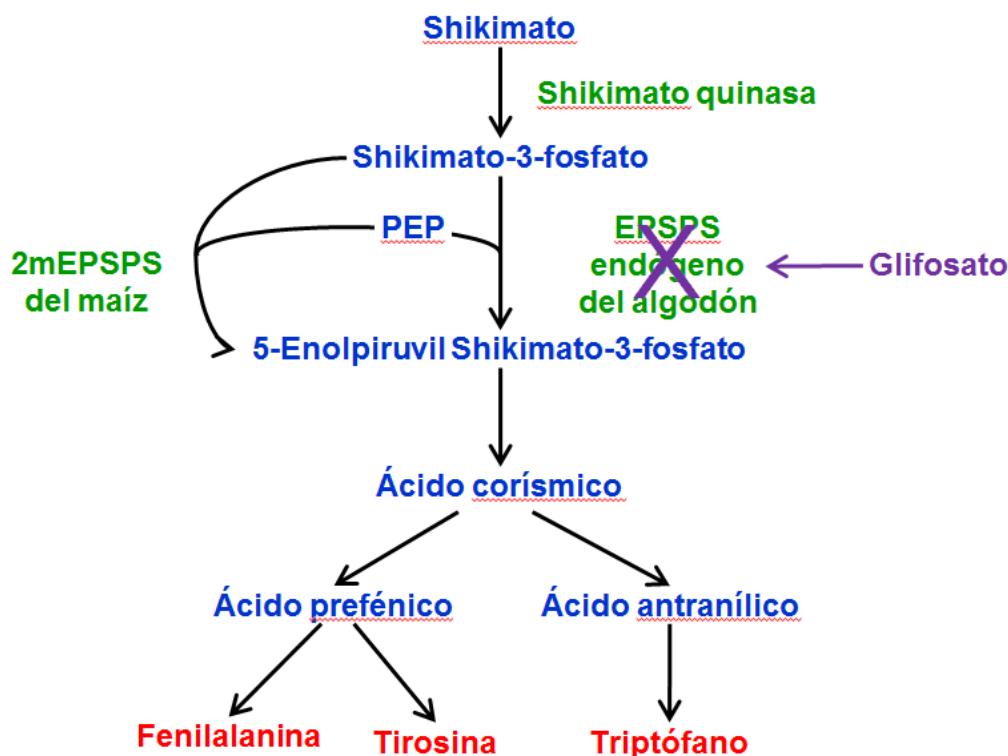
1. Proteína 2mEPSPS.

El evento GHB614 produce la proteína 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS) codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz (*Zea mays* L.) (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-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) (Figura 40).

Figura 40. 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. Proteína PAT/*bar*.

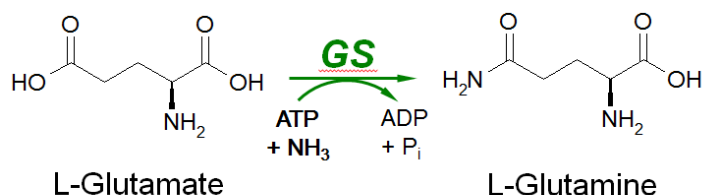
El algodón GHB614 x LLCotton25 contiene el cassette de expresión *bar* que, cuando se transcribe, origina la proteína PAT de ~21 kDa que consiste de un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La secuencia del gen *bar* proviene de *Streptomyces hygroscopicus* y codifica la proteína fosfotricina N-acetil transferasa (PAT) (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT en el algodón GHB614 x LLCotton25 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 41).

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).

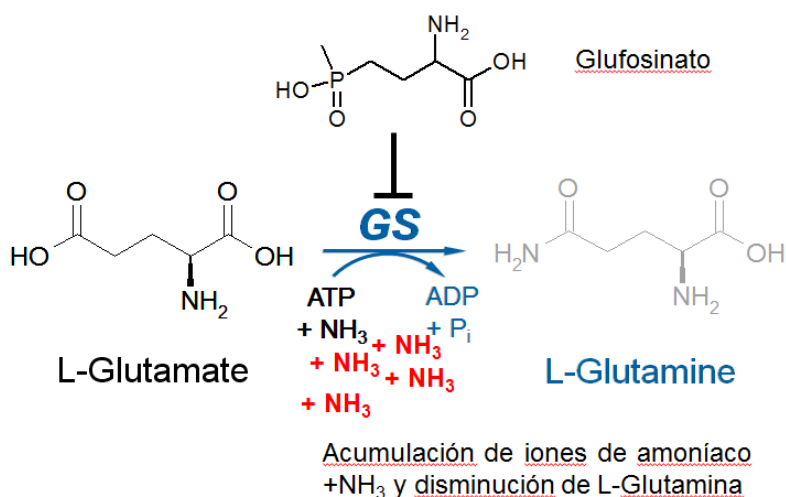
Figura 41. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.

a) Asimilación del amoníaco.



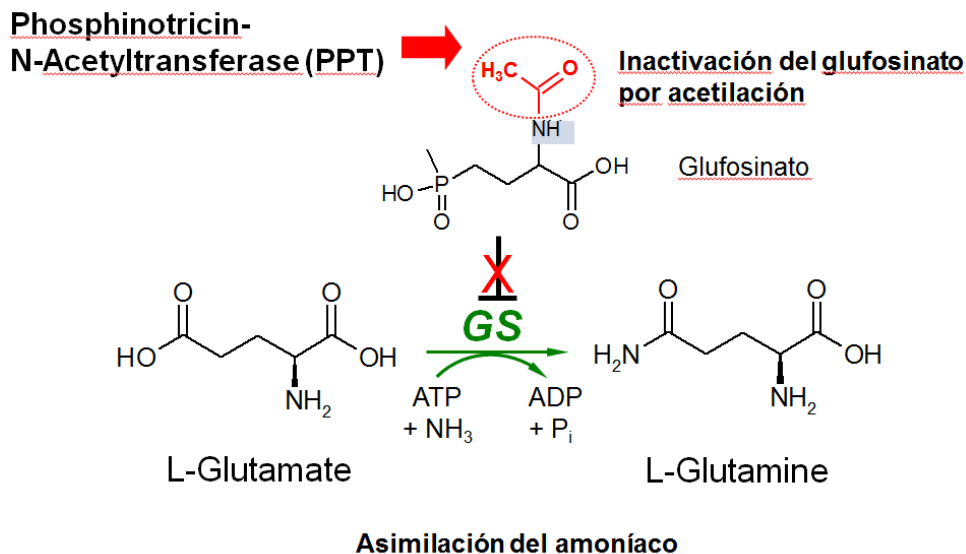
GS: Glutamine synthase

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 *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 42. 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.

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

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 LLCotton25 se presentan en el [cuadro 28](#). Aunque algunas secuencias reguladoras se derivan de patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens* y virus del mosaico de la coliflor (CaMV), estas secuencias no tienen capacidad de inducir enfermedades en el algodón.



Cuadro 28. Elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x LLCotton25.

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 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.	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)
LLCotton25			
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)

I.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 gossipol, una toxina natural presente en las plantas y semillas de algodón, limita el uso del cultivo y algunos de sus subproductos 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 animal⁴⁹.

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 venden a lecheros semilla de algodón deslinterada. 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.

⁴⁹ 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



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 gossipol 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 -tocoferol y 30 mg de β -tocoferol) para un α -tocoferol 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 deslinterada.

El deslinterado aumenta la densidad de nutrientes y el flujo del producto. En la mayoría de los procesos de deslinterado se utiliza un método mecánico para remover el *linter*, el cual deja entre un 1 - 2% de *linter* residual en la semilla. El deslinterado 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 y LLCotton25.

Los organismos donadores de los genes *2mepsps* y *bar* 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 LLCotton25 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. *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 estreptomycin. 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>)

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* y virus del mosaico de la coliflor (CaMV), 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, 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. Éstos 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. 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/>).

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

Los genes de selección utilizados durante la fase de laboratorio para cada evento parental (GHB614 y LLCotton25) se presentan en el [cuadro 29](#).

Cuadro 29. Resumen de los genes de selección utilizados para la obtención de los eventos parentales del algodón GHB614 x LLCotton25.

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
LLCotton25	<i>bar</i>	Bacteria (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)	Enzima fosfotricina-N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfotricina) por acetilación

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-enolpiruvilshikimate 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-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-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 del evento LLCotton25. 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.

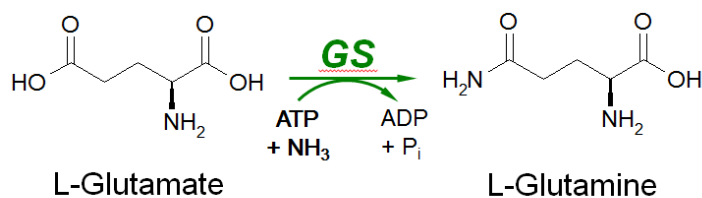
El evento LLCotton25 contiene el cassette de expresión *bar* que cuando se transcribe, origina la proteína PAT de ~21 kDa que consiste de un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La secuencia del gen *bar* proviene de *Streptomyces hygroscopicus* y codifica la proteína phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT en el algodón GHB614 x LLCotton25 confiere tolerancia a glufosinato de amonio (L-fosfotricina).

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 43).

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).

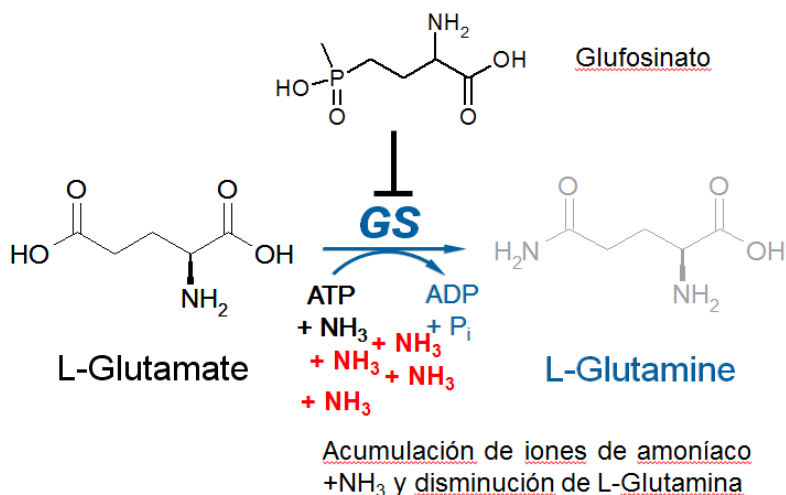
Figura 43. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.

a) Asimilación del amoníaco.



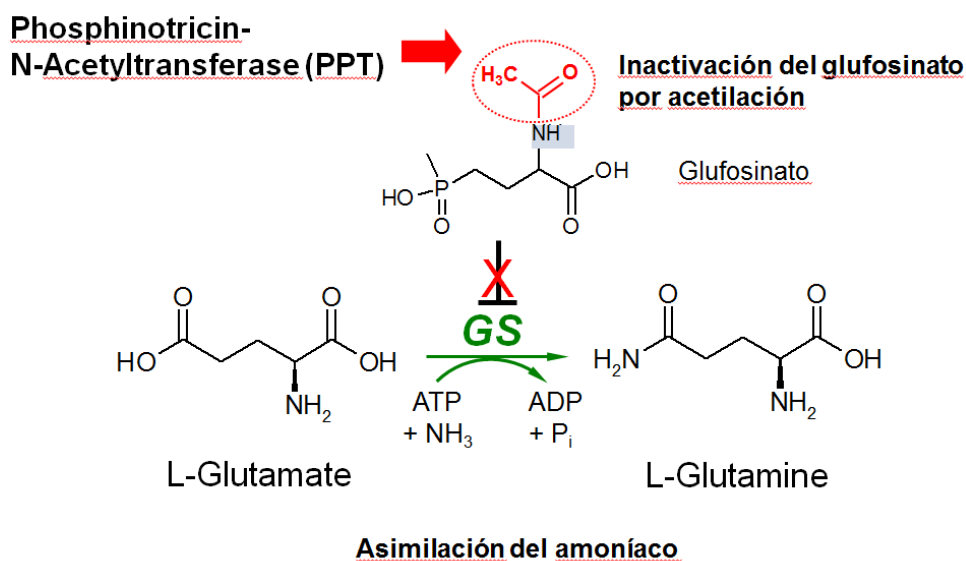
GS: Glutamine synthase

b) Inhibición de la enzima GS.



La enzima PAT es una acetiltransferasa que cataliza específicamente la acetilación de L-fosfinitricin (L-PPT) y demetilfosfinitricin (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 44. 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.

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

El algodón GHB614 x LLCotton25 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25. 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 45). 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 46 - 50). 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**⁵⁰).

Figura 45. 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 46. Estabilidad del evento GHB614 generación T₃.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

⁵⁰ Habex, V. 2006. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-279396-01-1.



Figura 47. Estabilidad del evento GHB614 generación T₄.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 48. Estabilidad del evento GHB614 generación T₅.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 49. Estabilidad del evento GHB614 generación T₆.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 50. Estabilidad del evento GHB614 generación BC₂F₂.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2. Evento LLCotton25.

La estabilidad estructural del evento LLCotton25 fue demostrada a través de de varias plantas individuales de múltiples orígenes y múltiples generaciones (LL25-C312-T₄; LL25-C312-T₅; LL25-FM966-BC₃/F₃; LL25-FM832-BC₃/F₃ (dos lotes de semillas); LL25-FM989-BC₃/F₃; LL25-H26-BC₃/F₃ y LL25-AVS9023-BC₃/F₃). El DNA aislado fue digerido con la enzima de restricción NcoI (Figura 51), que tiene dos sitios de reconocimiento en el ADN transformante. Las pruebas de digestión con esta encima mostro el fragmento de T-ADN esperado del borde izquierdo y borde derecho en todas las muestras analizadas.

Por medio de análisis de transferencia *Southern*, hemos demostrado que el fragmento de T-ADN interno y el fragmento de integración borde derecho de LL25 *Gossypium hirsutum*, resulta de la escisión con enzimas de restricción en el integrada T-ADN y en el ADN de la planta adyacente, son idénticos en todas las muestras analizadas (176 en total) (Figura 52 - 56). 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**⁵¹).

Figura 51. 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 52. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T₄).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

⁵¹ Aerts, M. 2015. Molecular demonstration of the stability of *Gossypium hirsutum* transformation event LL25 in different backgrounds and over different generations. Bayer CropScience N.V.- Innovation Center Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-208142-02-1.



Figura 53. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T₄).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 54. Estabilidad del evento LL25 (FM966 – Generacion: BC3/F3).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 55. Estabilidad del evento LL25 (FM832 – Generacion: BC3/F3 (semillas lote A)).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 56. Estabilidad del evento LL25 (AVS9023 – Generation: BC3/F3).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

3. Evento doble apilado GHB614 x LLCotton25.

El algodón GL fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614 y LLCotton25. El evento GHB614 se produjo por transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando el vector pTEM2 que contiene la secuencia codificante para la proteína 2mEPSPS que confiere tolerancia a los herbicidas al glifosato. Mediante un análisis *Southern* demostró que una copia del T-DNA del plásmido pTEM2 se introdujo en el algodón GHB614 (Habex y Leclair, 2006⁵²). El evento LLCotton25 fue producida por transformación mediada por *Agrobacterium* usando el vector binario pGSV71 que contiene el gen *bar*. Este gen codifica la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Al igual que el caso anterior un análisis de transferencia *Southern* demostró que una copia del ADN-T del plásmido pGSV71 se introdujo en el algodón LLCotton25 (Moens y De Beuckeleer, 2004⁵³).

La estabilidad de los insertos GHB614 x LLCotton25 fue evaluada en el ADN genómico del caso combinado mediante un análisis de transferencia de *Southern* digerido con la enzima *EcoRV* (Figura 57). El análisis mostró la presencia de los fragmentos de hibridación esperados de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25 en todas las muestras de ADN a prueba (Figura 58 - 59), y por lo tanto demostró la estabilidad estructural de la secuencia transgénica insertada de GHB614 y LLCotton25 en caso combinado GHB614 x LLCotton25 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**⁵⁴).

Figura 57. Esquema de la estrategia de hibridación para el análisis de la estabilidad estructural de los eventos combinados GHB614 x LLCotton25.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

⁵² Habex V. and Leclair M., 2006. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V., M-279390-03-1

⁵³ Moens M. and De Beuckeleer M., 2004. Molecular characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event LLCotton25. Bayer Bioscience N.V., M-237709-01-1

⁵⁴ Moens, S. 2010. Stability analysis of cotton combined events GHB614xLLCotton25. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-384909-01-1



Figura 58. Demostración de la estabilidad estructural de GHB614 en GHB614 x LLCotton25

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 59. Demostración de la estabilidad estructural de LLCotton25 en GHB614xLLCotton25

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

I.t. Referencia bibliográfica sobre los datos presentados

- Aerts, M.; De Beuckeleer, M. 2002. Analysis of the nature of the flanking sequences from *Gossypium hirsutum* event LL25. Aventis CropScience NV. Belgium.
- Aerts, M. & De Beuckeleer, M. 2002. *Gossypium hirsutum* transformation event LL25 PCR analysis Right Border and Left Border terminal repeats. Bayer CropScience N.V.
- Aerts, M. 2015. Molecular demonstration of the stability of *Gossypium hirsutum* transformation event LL25 in different backgrounds and over different generations. Bayer CropScience N.V.- Innovation Center Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium.
- 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.
- Bartlett, S., Grossman, A., Chua, N., Edelman, M., Hallick, R., & Chua, N. (1982). *Methods in chloroplast molecular biology*. Elsevier.
- Beban, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* Nov 26 ; 12(22) : 8711-21.
- Bentley, R. (1990). The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 25(5), 307–384.
- Berghman, S. & De Beuckeleer, M. 2002. Determination of inserted transgenic sequences in *Gossypium hirsutum* elite event LL25. Aventis CropScience N.V.
- Bolivar, F., Rodrigues, R., Greene, P., Betlach, M., Haymecker, 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.
- Botterman, J., Gosselé, V., Thoen, C. Y Lauwereys, M. (1991). Characterization of phosphinothricin acetyltransferase and C-terminal enzymatically active fusion proteins. *Gene*. 102(1): 33-37.
- Bourges, R. (2002). *Alimentos obsequio de México al mundo. La alimentación de los mexicanos*. México, D.F.: El Colegio Nacional.
- 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.
- 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.



- Cockburn, A. (-1. (2002). Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. *Journal of Biotechnology*, 98, 79-106.
- Cornelissen, M., & Vandewiele, M. (1989). Nuclear transcriptional activity of the tobacco plasmid psbA promoter. *Nucleic Acids Research.*, 17(1), 19-29.
- Currier, T. 2008. Structural stability analysis of cotton event GlyTolxLL. Study Number BK08Q002. Molecular & Biochemical Analytical Services. Research Triangle Park, NC 27709.
- De Beuckeller, M. 2004. Gossypium hirsutum elite event LLCotton25 Basic molecular analysis. Molecular & Biochemical Analytical Services, Nucleic Acid Characterization. Bayer CropScience N.V.
- De Beuckeleer M. 2003. Description of the amino acid sequence of the PAT protein encoded from the bar gene. Molecular & Biochemical Analytical Services. Bayer CropScience. #C033148.
- De Beuckeleer, M. 2001. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in Gossypium hirsutum transformation event LL25. Aventis CropScience NV. Belgium. M-207086-01-1.
- 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.
- 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 plasmid. *Nucleic Acid Research*, 13, 4777-4788.
- 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.
- 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.
- EPA. (2001). Exemption From the Requirement of a Tolerance Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act for Residues of Nucleic Acids that are Part of Plant-Incorporated Protectants (Formerly Plant-Pesticides). Environmental Protection Agency Final Rule. Federal Register, 66, 37817-37830.
- 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.
- FDA. (1992). Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Federal Register Food and Drug Administration, 57, 22984-23005.
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). 2008. Final assessment report. Application A614. Food derived from glyphosate-tolerant cotton line GHB614.
- Forlani, G., Parisi, B., & Nielsen, E. (1994). 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from Zea mays cultured cells. *Plant Physiol.*, 105, 1107-1114.
- 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. (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. (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.
- García Urigüen, P. (2012). La alimentación de los mexicanos. Cambios sociales y económicos, y su impacto en los hábitos alimenticios. Mexico, D.F.: CANACINTRA.
- Gedeon, T., & Bokes, P. (2012). Delayed protein synthesis reduces the correlation between mRNA and protein fluctuations. *Biophysical Journal*, 103, 377-385.
- Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. 1984. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *The EMBO Journal*, 3, 835-846. #A67239 (Anexo 5)
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., & Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4(9), 117.
- Green, P. (1993). Control of mRNA Stability in Higher Plants. *Plant Physiology*, 102, 1065-1070.
- Gupta, D., Shekhar, S., & Agrawal, L. (2015). Plant proteomics: Technology and applications. En D. Barh, M. Sarwar, & E. Davies, *PlantOmics: The Omics of Plant Science*. New Delhi, India: Springer.
- Gygi, S., Rochon, Y., Franza, B., & Aebersold, R. (1999). Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 1720-1730.
- Habex, V. 2015. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event LL25. Bayer CropScience N.V.- Innovation Center. Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium.
- Habex, V. 2014. Confirmation of the absence/presence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium.
- Habex, V. 2007. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V.
- Habex, V. 2006. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium.
- Habex, V. 2001. Demonstration of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event LL25. Bayer BioScience N.V. M-207086-02-1.
- Habex, V.; Leclair, M. 2014. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GH8614. Bayer CropScience N.V. Innovation Center. Belgium.
- Habex V. and Leclair M., 2006. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V., M-279390-03-1
- Habex, V.; Leclair, M. 2006. Demonstration of the nature of the flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer CropScience N.V.
- 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.
- Hooykaas, P., & Schilperoor, R. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant
- Hutchinson, J. (1959). The application of genetics to cotton improvement. London: Cambridge Univ. Press.
- Huttner, S.L., Arntzen, C., Beachy, R., Breuning, G., Nester, E., Qualset, C., Vidaver, A. (1992). Revising oversight of genetically modified plants. *Bio/Technology* 10: 967-971. *Molecular Biology*, 19, 15-38.
- Itoh, Y., Watson, J., D., H., & Leisinger, T. (1984). Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid*, 11, 206.



- Jeffries, T. A. 2013. GHB614 x LLCotton25 – Production and Protein Expression Analyses of Field Grown Samples. USA, 2012. Study Number 12-RSXFT009. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC 27709.
- 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.
- Kishore, G., & Shah, D. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. Annual Review of Biochemistry, 57, 627-663.
- Klee, H.J. and Rogers, S.G. (1989). Plant gene vectors and transformation: plant transformation system based on the use of *Agrobacterium tumefaciens*. In cell culture and simatic cell genetics, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, Schell, J. and Vasil, J.K. (eds), Academic Press, San Diego, pp 2-25.
- Lecleir, M. 2007. Description of vector pTEM2. Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium.
- 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).
- 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., Leroux, B., & Sailland, A. (1996). Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996). RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR).
- 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.
- Maier, T., Güell, M., & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples (Review). Federation of European Biochemical Societies, 583, 3966–3973.
- Meyer, V. (1973). Fertility restorer genes for cytoplasmic male sterility from *Gossypium harknessii*. Proceedings Beltwide Cotton (pág. 65). Phoenix, Arizona: Prod. Res. Conf.
- Milton Poehlman, J., & Sleper, D. A. (1995). Breeding field crops Fourth Edition. Iowa State University Press/Ames.
- Moens, S. 2010. Stability analysis of cotton combined events GHB614xLLCotton25. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium.
- Moens M. and De Beuckeleer M., 2004. Molecular characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event LLCotton25. Bayer Bioscience N.V., M-237709-01-1
- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Sathah, A., Nagaoka, K. and Thompson, C.J. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Molecular and General Genetics, 205, 42-50. # A50613
- 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. (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. (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. (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.
 - Palomo, A. (1996). Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 4, 359-369.
 - Payne, S. (2015). The utility of protein and mRNA correlation. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(1), 1-3.
 - Ponnala, L., Wang, Y., Sun, Q., & van Wijk, K. (2014). Correlation of mRNA and protein abundance in the developing maize leaf. *The Plant Journal*, 78, 424-440.
 - Pradet-Balade, B., Boulmé, F., Beug, H., Müllner, E. W., & Garcia-Sanz, J. (2001). Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 225-229.
 - Reynaerts, A. 1999. Description of vector pGSV71 (*Gossypium hirsutum*). Plant Genetic Systems NV.
 - 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.
 - Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - 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.
 - 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.
 - Steinrücken, H.C., Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 30; 94(4):1207-12.
 - 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 .
 - 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.
 - Trolinder-Wright, L. 2008. Agronomic Performance of Glyphosate and Glufosinate tolerant Cotton based upon stacked events GHB614 x LLCotton25 (GlyTol x LL cotton) In the 2007 USA production season. Bayer CropScience Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38 9052 GENT, Belgium.



- 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.
- USDA. (2011). Determination of non-regulated status for MON 87705 soybean. United States Department of Agriculture, Marketing and Regulatory Programs, Animal and Plant Health Inspection Service, Biotechnology Regulatory Services. http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/09_20101p_det.pdf.
- USDA. (USDA 2006. Approval of USDA-ARS Request (04-264-01P) Seeking a Determination of Nonregulated Status for C5 Plum Resistant to Plum Pox Virus. Finding of No Significant Impact and Decision Notice. APHIS-2006-0084-0002 in <http://www.regulations.gov>, accessed). Approval of USDA-ARS Request (04-264-01P) Seeking a Determination of Nonregulated Status for C5 Plum Resistant to Plum Pox Virus. Finding of No Significant Impact and Decision Notice. APHIS-2006-0084-0002 in <http://www.regulations.gov>, USDA 2006. Approval of USDA-ARS Request (04-264-01P) Seeking a Determination of Nonregulated Status for C5 Plum Resistant to Plum Pox Virus. Finding of No Significant Impact and Decision Notice. APHIS-2006-0084-0002 in <http://www.regulations.gov>, accessed, USDA 2006. Approval of USDA-ARS Request (04-264-01P) Seeking a Determination of Nonregulated Status for C5 Plum Resistant to Plum Pox Virus. Finding of No Significant Impact and Decision Notice. APHIS-2006-0084-0002 in <http://www.regulations.gov>, accessed.
- Van der Klis, R.; Hendrickx, K.; Herouet-Guichenev, C.; Rouan, D. 2006. The double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene product 2mEPSPS Description and Characterization. Bayer BioScience N.V. Belgium. INFORMACIÓN CONFIDENCIAL
- 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 K, Stachel SE, Timmerman B, Van Montagu M, Zambryski PC (1987) Site-specific nick in the T-DNA border sequence as a result of *Agrobacterium vir* gene expression. *Science* 235 587–591
- 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.
- Zambryski, P. (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mo1 Biol* 43: 465-490.
- Zambryski, P. (1988). Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Ann. Rev. Genet.*, 22, 1-30. *Plant Journal*. 23:11-28.
- 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.
- Zupan, J.; Muth, T.R.; Draper, O. & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights.



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

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

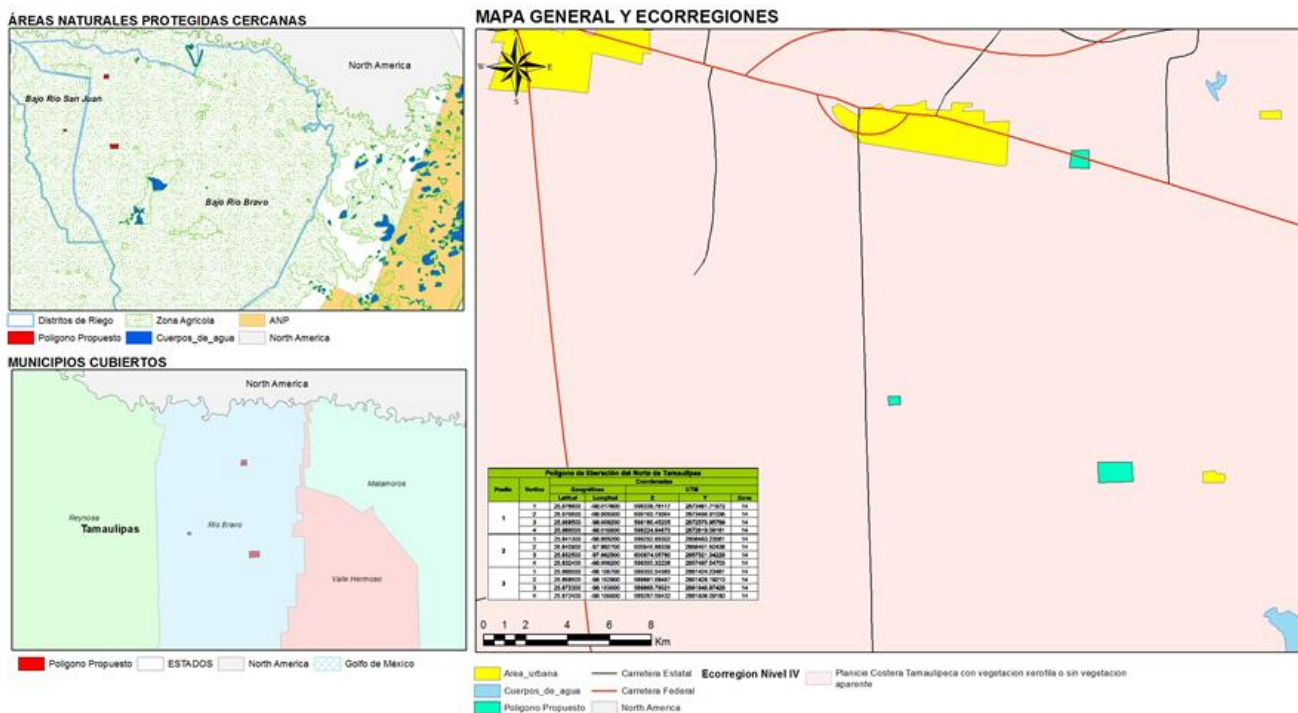
El algodón GL (BCS-GHØØ2-5 x ACS GHØØ1-3) será importado y/o movilizado en forma de semilla. En el cuadro se indica la cantidad de semilla que será importada y/o movilizada, así como las fechas propuestas de importación y/o movilización.

Cuadro 30. Superficie y cantidad de semilla a importar y/o movilizar para el programa experimental de algodón GL durante el ciclo PV-2017.

Región	Periodo de importación de la semilla	Periodo de siembra	Superficie (ha)	Densidad de siembra (kg)	Cantidad de semilla requerida (kg)
Tamaulipas Norte	Enero 2017	Febrero – Marzo 2017	1.5	17	25.5

La semilla importada será liberada en los sitios experimentales ubicados dentro de la región agrícola de de Tamaulipas Norte. En la [figura 60](#) se puede apreciar geográficamente los polígonos propuestos para la liberación en etapa experimental del algodón GlyTol® LibertyLink® durante el ciclo PV-2017.

Figura 60. Polígono propuesto para la liberación de algodón GL en etapa experimental en la región agrícola de Tamaulipas Norte.





Las fechas de siembra propuestas están dentro de los periodos recomendados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), para un buen establecimiento, desarrollo y producción del cultivo del algodón en las diferentes regiones (Cuadro 31).

Cuadro 31. Periodos de siembra regionales para el cultivo del algodón en México.

Región	Periodo de siembra	Periodo óptimo	Unidades calor (UC 86/55 °F) acumuladas desde el 1º. de enero	Referencia
Sonora Sur	1º de enero - 28 de febrero	1º de enero - 28 de febrero	-	Sistema Producto Algodón ⁵⁵
Valle de Mexicali, B.C. - San Luis Río Colorado, Son.	15 de febrero - 31 de marzo	1o. de marzo - 15 de marzo	Inico de siembra: 300 UC Optima: 400 - 700 UC	Hernández-Vázquez <i>et al.</i> , 2010 ⁵⁶ Herrera-Andrade <i>et al.</i> , 2010 ⁵⁷
Tamaulipas Norte	15 de febrero - 15 de marzo	1º de marzo - 7 de marzo	-	Loera-Gallardo <i>et al.</i> , 2015 ⁵⁸
Comarca Lagunera	15 de marzo - 15 de abril	15 de marzo - 15 de abril	-	Sistema Producto Algodón
Chihuahua Norte	16 de abril - 20 de mayo	25 de abril - 5 de mayo	-	SAGARPA-SENASICA-INIFAP ⁵⁹ Quiñones-Pando <i>et al.</i> , 2000 ⁶⁰
Chihuahua Noroeste	16 de abril - 20 de mayo	25 de abril - 5 de mayo	-	SAGARPA-SENASICA-INIFAP Quiñones-Pando <i>et al.</i> , 2000
Chihuahua Sureste - Ojinaga	16 de abril - 20 de mayo	20 de abril - 30 de abril	-	SAGARPA-SENASICA-INIFAP Quiñones-Pando <i>et al.</i> , 2000
Chihuahua Sureste - Delicias	1º. de abril - 10 de mayo	20 de abril - 30 de abril	-	SAGARPA-SENASICA-INIFAP Quiñones-Pando <i>et al.</i> , 2000
Tamaulipas Sur	15 de junio - 27 de julio	-	-	CESTAM-INIFAP ⁶¹

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

Los sitios donde se pretende realizar las liberaciones del algodón GlyTol® LibertyLink® están ubicados dentro de los polígonos cuyos vértices se presentan en los [cuadro 8](#).

⁵⁵ Sistema Producto Algodón. 2012. Plan rector del sistema producto algodón. Comité Nacional del Sistema Producto Algodón, A.C. México, D.F.

⁵⁶ Hernández-Vázquez, B.; Alvarado-Padilla, J.I.; Ávila-Casillas, E.; Payan-Ochoa, S.; Morales-Maza, A.; Loza-Venegas, E. 2010. Guía técnica para el área de influencia del Campo Experimental Valle de Mexicali. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Valle de Mexicali. Mexicali, Baja California, México.

⁵⁷ Herrera-Andrade, J.L.; Guzmán-Ruiz, S.; Loza-Venegas, E. 2010. Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali, B. C. y San Luis Río Colorado, Son. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigalción Regional Del Noroeste. Campo Experimental Valle De Mexicali. Mexicali, B.C.

⁵⁸ Loera-Gallardo, J.; Rosales-Robles, E.; Reyes-Rosas, M.A. 2015. Guía para Cultivar Algodón en el Norte de Tamaulipas. Campo Experimental Río Bravo, CIR-Noreste-INIFAP.

⁵⁹ Pimentel-Alvarado, O.; Delgadillo-Aldrete, S. 2015. Agenda técnica agrícola Chihuahua. 2da Edición. SAGARPA-SENASICA-INIFAP. México.

⁶⁰ Quiñones-Pando, F.J.; Galván-Lamas, R.; Báez-Iracheta, F. 2000. Tecnología de producción de algodón en la región centro sur del Estado de Chihuahua. Folleto para productores No. 4. Fundación PRODUCE-Chihuahua. Delicias, Chih., México.

⁶¹ INIFAP. 1997. Algodón de temporal en el Sur de Tamulipas. Campo Experimental Sur de Tamaulipas-INIFAP.



Cuadro 32. Vértices del polígono propuesto para la liberación al ambiente de algodón GL en etapa experimental en Tamaulipas Norte.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

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

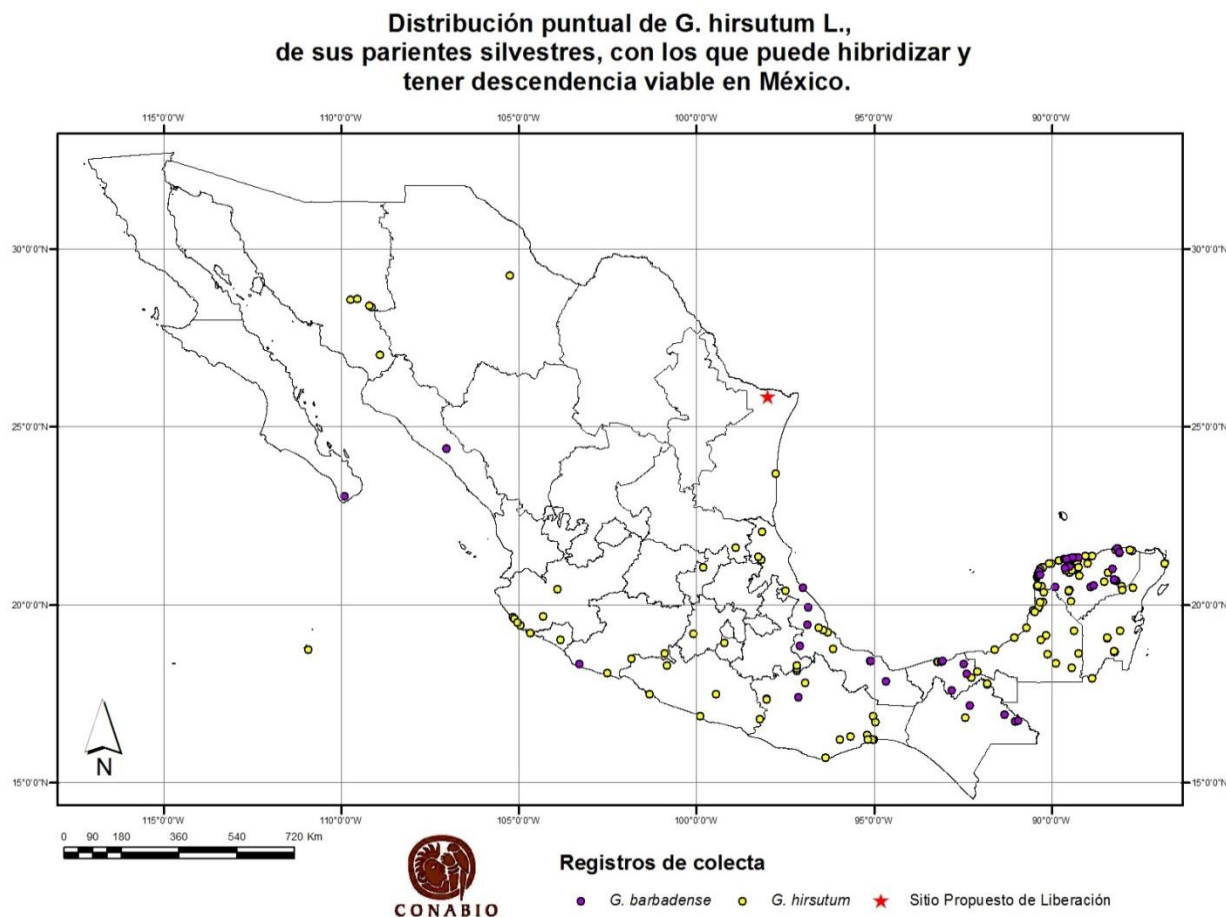
II.c.1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos

No existen especies sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*Gossypium hirsutum*) en las áreas de liberación propuestas. 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 33). 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 de los polígonos propuestos para el Norte de Tamaulipas, no se reportan sitios de colecta cercanos a las áreas de liberación propuestas (Figura 61).

Cuadro 33. 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 61. Distribución puntual de *G. hirsutum* y *G. barbadense* con relación al polígono de liberación propuesto para la liberación de algodón GlyTol® LibertyLink®.



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). Aunado a esta barrera genética se tiene una barrera temporal, esto es, que no se presenta coincidencia en los periodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales, lo cual minimiza el riesgo de flujo de polen entre ellas. 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 pedregosos.

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

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

G. harknessii 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.

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 CONABIO⁶², se tienen registros para los Estados de Baja California Sur, Sinaloa, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán (www.conabio.gob.mx).

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.

Los estudios de Hutchinson (1959) sobre la variabilidad existente en la especie *hirsutum* identifican seis razas geográficas: *latifolium*, *morrilli*, *palmeri*, *richmondii*, *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 richmondii, 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 ovals 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) se 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.*

⁶² Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.



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 la de todos los miembros de Malvaceae, es receptiva únicamente el día en que abre.

El algodón es una planta dioica que se reproduce predominantemente mediante autopolinización. Las flores del algodnero 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.

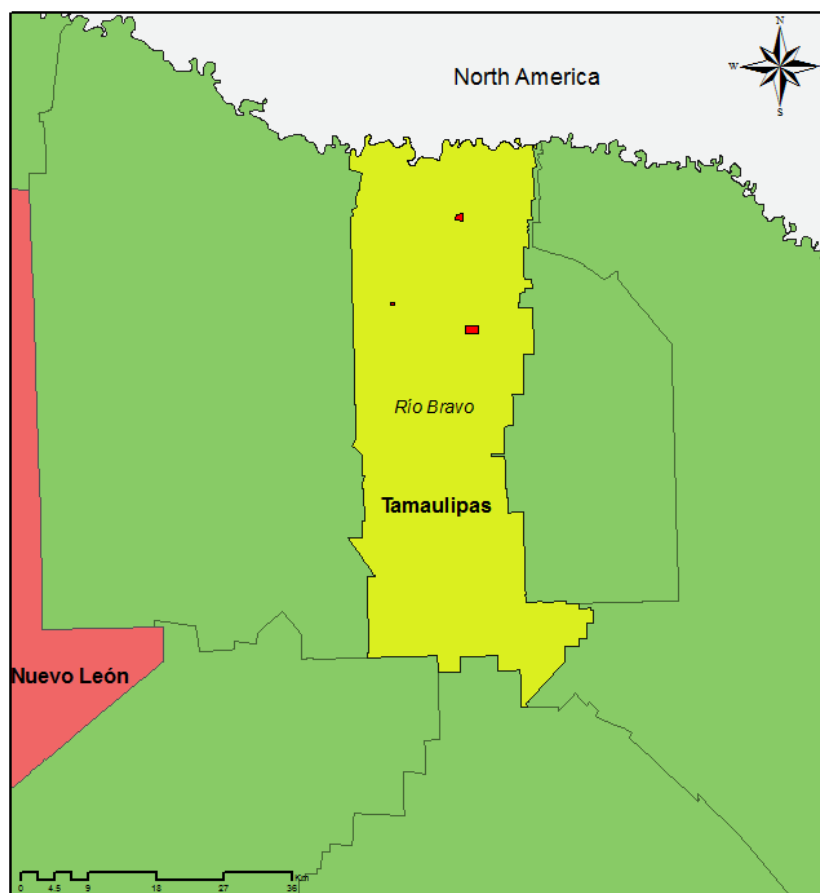
Aún cuando estén presentes altas poblaciones de insectos, el transporte del polen disminuye significativamente al incrementarse la distancia. En un experimento reportado por McGregor (1976) en el cual un campo de algodón rodeado por un gran número de colonias de abejas y el movimiento de polen fue marcado 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 consideró 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).

II.c.1. Descripción geográfica

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en las áreas agrícolas del norte del Estado de Tamaulipas en el municipio de Río Bravo. (Figura 62).

Figura 62. Sitios de liberación de algodón GlyTol® LibertyLink® en la región de Tamaulipas Norte.

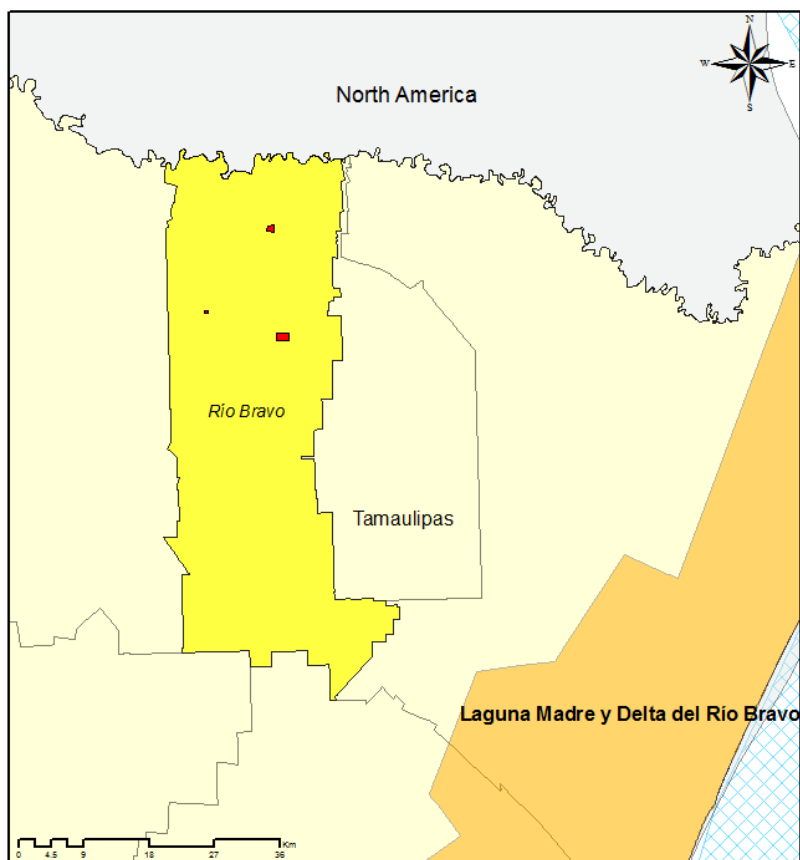


II.c.2. Plano de ubicación señalando vías de comunicación

2.1. Áreas Naturales Protegidas.

La liberación del algodón GlyTol® LibertyLink® se hará exclusivamente dentro del polígono especificado en esta solicitud, el cual se encuentra a una distancia mayor a 1 km de las áreas naturales protegidas: **Laguna Madre**; 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 necesarias para que la liberación del algodón genéticamente modificado GlyTol® LibertyLink® no se realice en las zonas núcleo y a menos de un kilómetro de las Áreas Naturales Protegidas anteriormente mencionadas (Figura 63).

Figura 63. Áreas Naturales Protegidas aledañas al polígono de liberación en Tamaulipas Norte.





2.2. Sitios Ramsar.

Dentro del polígono de liberación del estado de Tamaulipas, no existen zonas de traslape con los sitios Ramsar: **Sitio Ramsar No. 1326 - Playa Tortuguera Rancho Nuevo** y **Sitio Ramsar No. 1362 - Área de Protección de Flora y Fauna Laguna Madre** (Figura 64 y Cuadro 34), que son los únicos sitios con estas características cercanos al sitio de liberación.

De conformidad con información del INEGI sobre tierras cultivables en México (Serie V, INEGI, 2013), se desprende que existe actividad agrícola en 90 de los sitios Ramsar decretados en nuestro país, los cuales ocupan una superficie agrícola total de 358,090 ha.

Considerando que la liberación de algodón GM se realiza solo dentro de las áreas agrícolas o agroecosistemas ya establecidos, no se genera un cambio directo, ya que se trata de predios con vocación agrícola dentro de los sitios Ramsar, en donde actualmente se realiza la siembra de diversos cultivos convencionales. Por el contrario, la siembra de algodón GM en relación con los cultivos convencionales, podría significar un cambio positivo no solo debido a los beneficios económicos y sociales para la región, sino especialmente por disminuir el impacto ambiental que genera la actividad agrícola al reducir el uso de plaguicidas y mejorar, consecuentemente, la calidad de agua que escurre hacia los humedales.

Incluso, la propia Convención de Sitios Ramsar reconoce que “Los humedales se han utilizado para la agricultura desde hace milenios, especialmente los humedales fluviales en llanuras aluviales donde los suelos son fértiles y el agua abundante”, aunque reconoce también que la conversión para usos agrícolas es una de las principales causas de la destrucción de sitios Ramsar. Por lo tanto, se concluye que “se deben considerar las funciones y los valores económicos de los humedales en la planificación de la producción de alimentos y otros productos agrícolas”.

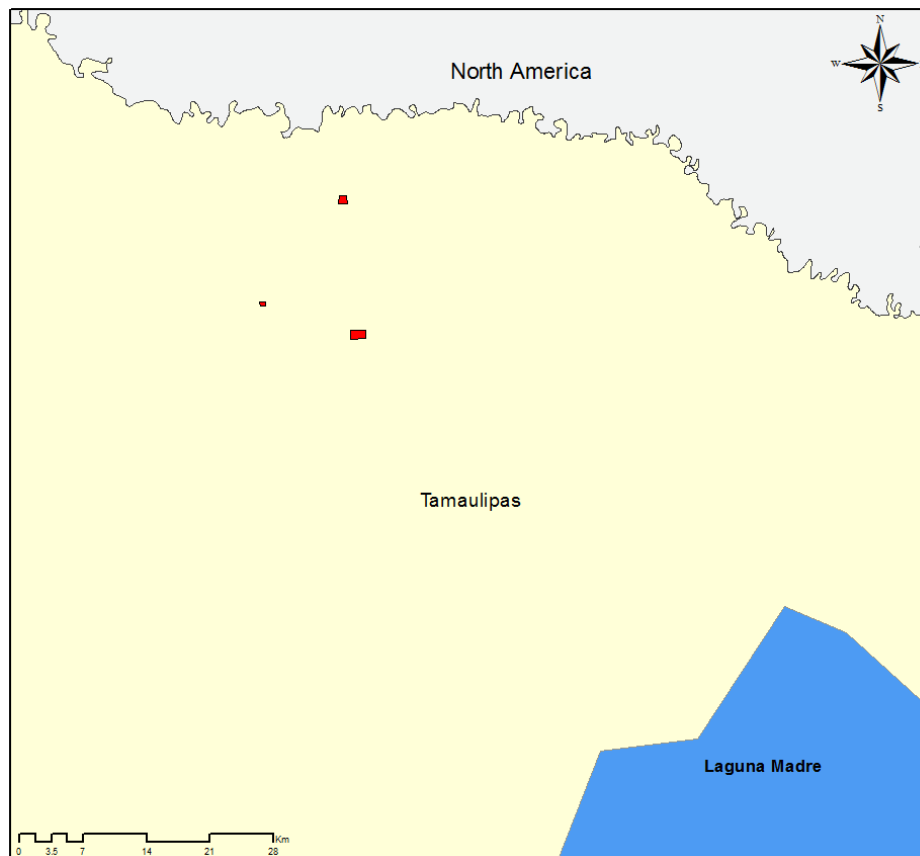
De la misma manera, la Convención de Sitios Ramsar reconoce que “La mejora de la productividad agrícola de la tierra y el agua puede contribuir a limitar la cantidad de agua que se extrae de los humedales y a desalentar su conversión para la agricultura”, y la biotecnología agrícola, precisamente, busca eficientar los espacios de siembra y generar mayor productividad en el campo mexicano.

Dicha Convención parte de que, además de la protección de los humedales, hay que tomar en cuenta otras problemáticas de la población, como la pobreza y el hambre, reconociendo que “la agricultura es con frecuencia un motor principal del crecimiento económico en los países en desarrollo y proporciona un apoyo económico decisivo para los hogares pobres del medio rural”.

Al hacerse referencia al uso de humedales para la producción agrícola, se reconoce por la Convención de Sitios Ramsar la existencia de “Ecosistemas de humedales que se han convertido en cierto grado pero conservan una gama modificada de servicios ecosistémicos que contribuyen a la producción agrícola”.

La interacción humedales - agricultura, implica buscar un justo equilibrio, como se señala por la Convención de Sitios Ramsar, en donde “La experiencia y las observaciones extraídas de muchos humedales muestran que es posible encontrar beneficios mutuos para la agricultura y para los humedales”.

Figura 64. Sitios Ramsar cercanos a el polígono de liberación de algodón GL en en la región de Tamaulipas Norte.



Cuadro 34. Superficie de sitios Ramsar cercanos a los polígonos propuestos de liberación de algodón GL.

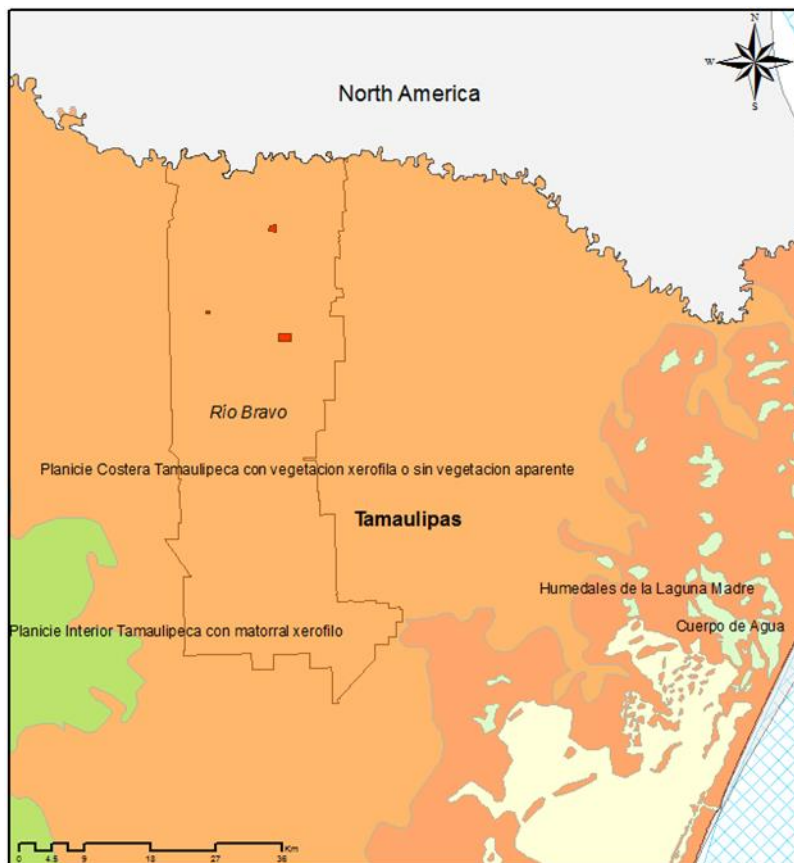
Nombre del Sitio Ramsar	Modalidad de conservación	Fecha de decreto	Municipio(s) y Estados de traslape	Superficie de traslape (ha)
Playa Tortuguera Rancho Nuevo	Sitio Ramsar	27-Nov-03	Villa de Aldama	30
Área de Protección de Flora y Fauna Laguna Madre	Sitio Ramsar	02-Feb-04	Matamoros, San Fernando, Soto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

2.1.3. Regiones ecológicas nivel IV.

Los sitios de liberación en el Norte del Estado de Tamaulipas se encuentra situado dentro de la ecorregión Nivel I “Grandes planicies” y comprende a su vez, tres ecorregiones Nivel IV, que han sido determinadas con base en criterios de topoformas, datos de vegetación primaria, límites de unidades geológicas y límites de suelos en escala 1:1 000 000 (Figura 65).

- ✓ 9.5.1.2 Planicie Costera Tamaulipeca con vegetación xerófila o sin vegetación aparente.
- ✓ 9.6.1.1 Planicie interior Tamaulipeca con matorral xerófilo.
- ✓ 9.5.1.1 Humedales de la Laguna Madre.

Figura 65. Regiones ecológicas nivel IV que se traslapan con la región agrícola de Tamaulipas Norte.





2.1.4. Plano de ubicación señalando vías de comunicación.

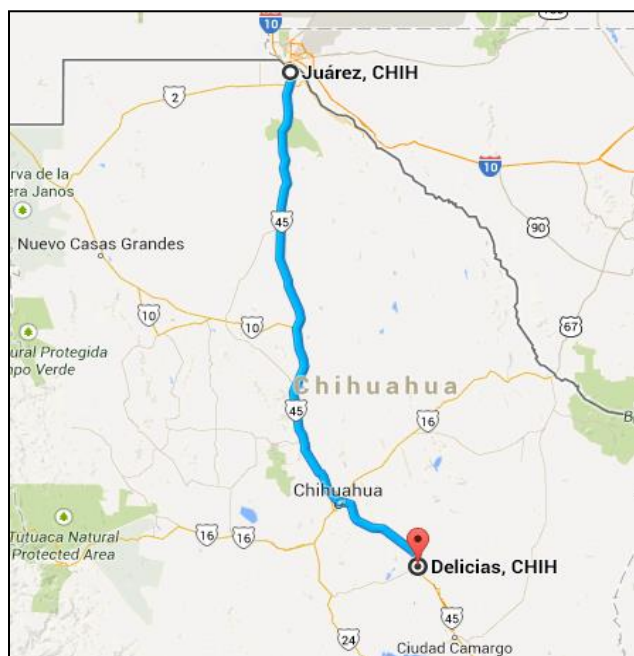
Se presentan los mapas de la SCT de las carreteras y caminos de los Estados de Tamaulipas, Chihuahua y Coahuila en donde se puede observar con mayor detalle la ruta de transporte de la semilla y las posibles rutas alternas, en caso de que se presente algún imprevisto. En el mapa principal de dichos anexos, 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 66), 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 66. Ruta de movilización de Cd. Juárez a Delicias, Chih.



Origen: Puente Libre de Córdoba S/N Área de Chamizal, C.P. 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua.

Coordenadas geográficas: 28.18260 N, - 105.44907 W

Destino: Almacén Bayer, Km 3 Carretera Panamericana Sur S/N, Sector Oriente, C.P. 33019, Cd. Delicias, Chihuahua.

RUTA

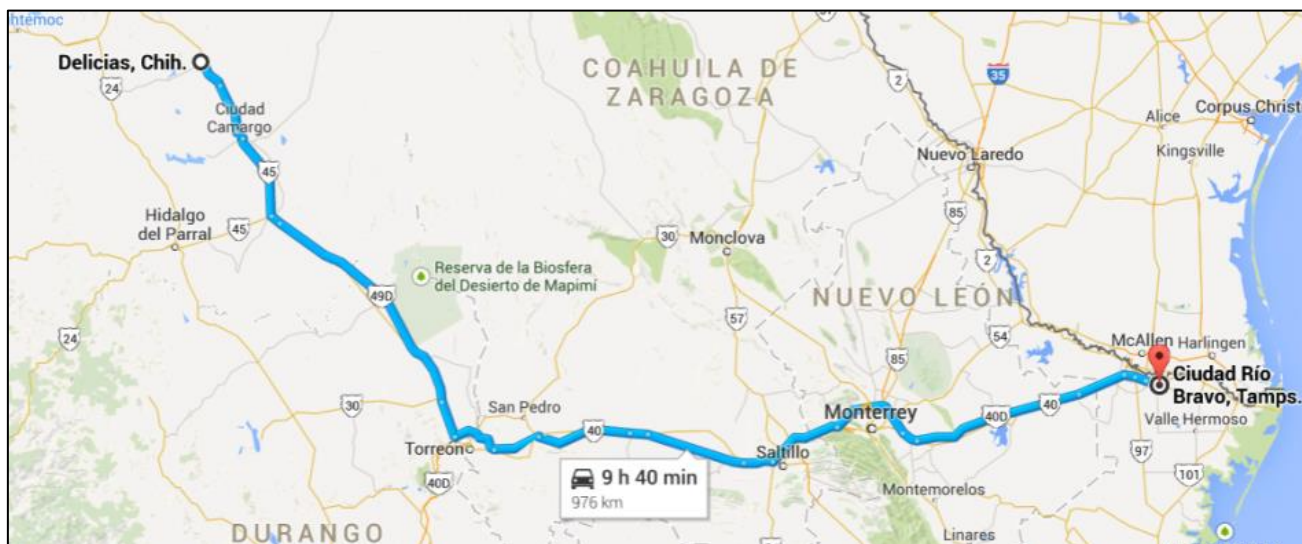
Carreteras: Mex 045 y 045 D

Distancia: 436 km

Puntos intermedios: Cd. Juárez, Ahumada, El Sueco, Sacramento, Chihuahua y Delicias.



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.



Destino: Río Bravo, Tamaulipas.

RUTA

Carreteras: Mex 045D, 049 D, 049, 040D, N. L S/N.

Distancia: 974 km

Puntos intermedios: Camargo, Chih., Jiménez, Chih., Torreón, Coah., Matamoros, Coah., Saltillo, Coah., Monterrey, N.L., Cadereyta, N.L.

De esta ubicación el material será trasladado por tierra a los sitios donde se realice la evaluación en la region del Norte del estado de Tamaulipas.

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

III.a. Estabilidad de la modificación genética del OGM

El algodón GHB614 x LLCotton25 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614 y LLCotton25. 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 67). 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 68 - 72). 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**⁶³).

Figura 67. 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 68. Estabilidad del evento GHB614 generación T₃.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 69. Estabilidad del evento GHB614 generación T₄.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 70. Estabilidad del evento GHB614 generación T₅.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 71. Estabilidad del evento GHB614 generación T₆.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 72. Estabilidad del evento GHB614 generación BC₂F₂.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

2. Evento LLCotton25.

La estabilidad estructural del evento LLCotton25 fue demostrada a través de de varias plantas individuales de múltiples orígenes y múltiples generaciones (LL25-C312-T₄; LL25-C312-T₅; LL25-FM966-BC₃/F₃; LL25-FM832-BC₃/F₃ (dos lotes de semillas); LL25-FM989-BC₃/F₃; LL25-H26-BC₃/F₃ y LL25-AVS9023-BC₃/F₃). El DNA aislado fue digerido con la enzima de restricción *NcoI* (Figura 73, que tiene dos sitios de reconocimiento en el ADN transformante. Las pruebas de digestión con esta encima mostro el fragmento de T-ADN esperado del borde izquierdo y borde derecho en todas las muestras analizadas.

Por medio de análisis de transferencia *Southern*, hemos demostrado que el fragmento de T-ADN interno y el fragmento de integración borde derecho de LL25 *Gossypium hirsutum*, resulta de la escisión con enzimas de restricción en el integrada T-ADN y en el ADN de la planta

⁶³ Habex, V. 2006. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-279396-01-1.



adyacente, son idénticos en todas las muestras analizadas (176 en total) (Figura 74 - 78). 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**⁶⁴).

Figura 73. 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 74. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T₄).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 75. Estabilidad del evento LL25 (Coker312 – Generacion: T₄).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 76. Estabilidad del evento LL25 (FM966 – Generacion: BC3/F3).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 77. Estabilidad del evento LL25 (FM832 – Generacion: BC3/F3 (semillas lote A)).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 78. Estabilidad del evento LL25 (AVS9023 – Generation: BC3/F3).

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

3. Evento doble apilado GHB614 x LLCotton25.

El algodón GL fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614 y LLCotton25. El evento GHB614 se produjo por transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando el vector pTEM2 que contiene la secuencia codificante para la proteína 2mEPSPS que confiere tolerancia a los herbicidas al glifosato. Mediante un análisis *Southern* demostró que una copia del T-DNA del plásmido pTEM2 se introdujo en el algodón GHB614 (Habex y Leclair, 2006⁶⁵). El evento LLCotton25 fue producida por transformación mediada por *Agrobacterium* usando el vector binario pGSV71 que contiene el gen *bar*. Este gen codifica la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Al igual que el caso anterior un análisis de

⁶⁴ Aerts, M. 2015. Molecular demonstration of the stability of *Gossypium hirsutum* transformation event LL25 in different backgrounds and over different generations. Bayer CropScience N.V.- Innovation Center Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-208142-02-1.

⁶⁵ Habex V. and Leclair M., 2006. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V., M-279390-03-1



transferencia Southern demostró que una copia del ADN-T del plásmido pGSV71 se introdujo en el algodón LLCotton25 (Moens y De Beuckeleer, 2004⁶⁶).

La estabilidad de los insertos GHB614 x LLCotton25 fue evaluada en el ADN genómico del caso combinado mediante un análisis de transferencia de *Southern* digerido con la enzima *EcoRV* (Figura 79). El análisis mostró la presencia de los fragmentos de hibridación esperados de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25 en todas las muestras de ADN a prueba (Figura 80 - 81), y por lo tanto demostró la estabilidad estructural de la secuencia transgénica insertada de GHB614 y LLCotton25 en caso combinado GHB614 x LLCotton25 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**⁶⁷).

Figura 79. Esquema de la estrategia de hibridación para el análisis de la estabilidad estructural de los eventos combinados GHB614 x LLCotton25.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 80. Demostración de la estabilidad estructural de GHB614 en GHB614 x LLCotton25

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 81. Demostración de la estabilidad estructural de LLCotton25 en GHB614xLLCotton25

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

4. Conclusión.

Tomando en cuenta la estabilidad de los elementos genéticos por varias generaciones, la segregación mendeliana también por varias generaciones, el bajísimo potencial de recombinación entre los insertos en el evento GlyTol® LibertyLink®, y la viabilidad e idoneidad seriamente comprometidas de las células afectadas por el evento hipotético de translocación genómica, el riesgo de tal recombinación es descartable. Se concluye que los insertos de DNA en el algodón GL se integraron de manera estable y las características conferidas son fenotípica y genéticamente estables a través de varias generaciones y condiciones ambientales.

Los análisis de segregación demostraron patrones de herencia Mendeliana de las características de tolerancia a herbicidas después de autopolinización o retrocruzamiento del algodón GlyTol® LibertyLink® con otras variedades de algodón. La tolerancia a herbicidas se ha mantenido durante el desarrollo de estos eventos, al igual que la calidad de la semilla, que se ha mantenido después de la transferencia de los eventos dentro de distintas variedades del programa de mejoramiento genético de algodón de Bayer. De acuerdo con estos resultados, no existe evidencia de inestabilidad genética de los eventos en el algodón GlyTol® LibertyLink®.

⁶⁶ Moens M. and De Beuckeleer M., 2004. Molecular characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event LLCotton25. Bayer Bioscience N.V., M-237709-01-1

⁶⁷ Moens, S. 2010. Stability analysis of cotton combined events GHB614xLLCotton25. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-384909-01-1



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

En el caso altamente improbable en el cual ocurriera recombinación que involucrara los insertos en el evento GlyTol® LibertyLink®, éste sería un proceso de translocación entre las secuencias que son homólogas entre los insertos de GHB614 y LLCotton25, limitadas al promotor 35S. La única consecuencia posible sería la modificación del nivel de expresión de los genes afectados y no una modificación de la calidad de la proteína producida. Incluso si este evento hipotético sucediera, afectaría sólo unas pocas semillas y, por lo tanto, la cantidad total de proteínas resultantes de este raro evento seguirían siendo extremadamente bajas y el nivel de exposición a dichas proteínas no cambiaría significativamente. Debido a la seguridad demostrada de las proteínas recombinantes introducidas en el algodón GL, el riesgo que podría surgir de esta recombinación hipotética es insignificante.

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

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 2mEPSPS y PAT/*bar* para el evento apilado GL en hoja, cuadros y semilla en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V7, inicio de cuadros y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo con y sin aplicaciones de herbicida, establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos durante el ciclo 2012 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**⁶⁸). Los resultados de la determinación del nivel de expresión de las proteínas se presentan en los Cuadros 35 - 38.

⁶⁸Jeffries, T. A. 2013. GHB614 x LLCotton25 – Production and Protein Expression Analyses of Field Grown Samples. USA, 2012. Study Number 12-RSXFT009. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC 27709. M-447807-01-1



Cuadro 35. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapas de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	156 ± 98	76.6 – 459	726 ± 310	500 – 1,520
		GHB614 x LLCotton25	124 ± 70	54.3 - 357	641 ± 240	359 – 1,130
	Raíz	GHB614	15.2 ± 3.0	9.01 - 19.6	75.5 ± 25	41.8 - 132
		GHB614 x LLCotton25	13.3 ± 3.9	4.68 - 18.6	9 76.0 ± 36	20.4 - 149
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	92.8 ± 38	37.8 - 161	457 ± 140	249 - 676
		GHB614 x LLCotton25	84.3 ± 34	30.7 - 136	493 ± 190	251 - 883
	Bellotas inmaduras	GHB614	32.1 ± 19	11.9 - 71.1	199 ± 110	86.5 - 405
		GHB614 x LLCotton25	29.9 ± 20	9.08 - 62.6	221 ± 140	95.5 - 489
Madurez	Semilla con borra	GHB614	99.3 ± 12	80.8 - 128	113 ± 13	96.7 - 143
		GHB614 x LLCotton25	96.0 ± 9.3	81.1 - 114	109 ± 11	93.3 - 127

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 36. Niveles de expresión de la proteína 2mEPSPS en tejidos de algodón GHB614 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapas de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	138 ± 71	60.7 - 300	704 ± 270	339 - 1,230
		GHB614 x LLCotton25	134 ± 85	43.4 - 405	704 ± 290	386 - 1,360
	Raíz	GHB614	15.6 ± 2.9	10.7 - 19.2	86.9 ± 26	59.7 - 133
		GHB614 x LLCotton25	13.9 ± 2.5	9.61 - 17.5	72.8 ± 20	42.1 - 110
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	86.3 ± 29	57.9 - 162	460 ± 140	275 - 679
		GHB614 x LLCotton25	83.8 ± 32	35.6 - 147	488 ± 180	283 - 772
	Bellotas inmaduras	GHB614	24.5 ± 14	10.9 - 49.2	165 ± 66	96.9 - 279
		GHB614 x LLCotton25	25.1 ± 14	10.7 - 50.9	173 ± 38	127 - 241
Madurez	Semilla con borra	GHB614	82.4 ± 16	47.6 - 112	93.0 ± 19	53.6 - 123
		GHB614 x LLCotton25	85.5 ± 13	62.1 - 116	97.1 ± 16	71.6 - 126

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).



Cuadro 37. Niveles de expresión de la proteína **LLCotton25** en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 sin aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	147 ± 40	96.7 - 240	860 ± 100	749 - 1,030
		GHB614 x LLCotton25	136 ± 40	84.2 - 210	727 ± 87	576 - 855
	Raíz	GHB614	46.6 ± 9.3	29.6 - 67.6	232 ± 50	143 - 335
		GHB614 x LLCotton25	40.3 ± 5.2	28.7 - 51.0	222 ± 62	136 - 356
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	172 ± 48	118 - 270	941 ± 160	716 - 1,150
		GHB614 x LLCotton25	182 ± 29	116 - 238	1,090 ± 180	814 - 1,460
	Bellotas inmaduras	GHB614	61.8 ± 37	14.5 - 135	461 ± 290	87.4 - 884
		GHB614 x LLCotton25	86.5 ± 55	26.8 - 184	634 ± 380	296 - 1,380
Madurez	Semilla con borra	GHB614	180 ± 31	130 - 237	204 ± 33	150 - 248
		GHB614 x LLCotton25	179 ± 25	135 - 233	203 ± 27	164 - 256

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).

Cuadro 38. Niveles de expresión de la proteína LLCotton25 en tejidos de algodón LLCotton25 y GHB614 x LLCotton25 con aplicación de herbicidas.

Etapa de desarrollo	Matrix	Evento	peso seco µg/g		peso fresco µg/g	
			Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
4 – 7 hojas	Hoja	GHB614	144 ± 50	60.8 - 276	775 ± 160	437 - 945
		GHB614 x LLCotton25	144 ± 52	85.5 - 279	788 ± 100	667 - 995
	Raíz	GHB614	41.8 ± 7.0	32.8 - 62.8	224 ± 50	170 - 347
		GHB614 x LLCotton25	40.1 ± 4.7	30.1 - 48.3	209 ± 47	158 - 302
2 semanas después de primera flor	Cuadros	GHB614	156 ± 67	62.4 - 275	884 ± 400	360 - 1,490
		GHB614 x LLCotton25	149 ± 60	63.4 - 263	921 ± 450	322 - 1,620
	Bellotas inmaduras	GHB614	54.9 ± 25	15.5 - 97.4	407 ± 160	127 - 645
		GHB614 x LLCotton25	58.1 ± 22	31.4 - 113	435 ± 110	242 - 600
Madurez	Semilla con borra	GHB614	157 ± 24	97.2 - 221	178 ± 26	131 - 234
		GHB614 x LLCotton25	162 ± 22	130 - 205	183 ± 22	153 - 224

Promedios de peso fresco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=48) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo, 2 extracciones de laboratorio para cada replica de campo y duplicar los ensayos ELISA para cada extracto). Promedios de peso seco, desviaciones estándar y rangos se basan en el total de observaciones (n=12) para todas las matrices (3 ensayos, 4 repeticiones por ensayo).



Salvo la característica de tolerancia a los herbicidas glifosato (gen *2mepsps*), y glufosinato de amonio (gen *bar*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón GL. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas en el algodón GL (heredadas de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25) no le confieren ninguna característica fenotípica adicional. Este evento de algodón biotecnológico no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional o con los eventos parentales individuales.

III.c. Características del fenotipo del OGM

El algodón **GHB614 x LLCotton25** fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614 y LLCotton25. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x LLCotton25 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.

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 **LLCotton25** produce 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.

La combinación de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (LLCotton25) 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.

El evento GlyTol® LibertyLink® no exhibe ninguna característica fenotípica adicional que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso poco probable de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de la característica de tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, a especies en hábitats no agrícolas no conferiría ventaja competitiva alguna, dado que la tecnología funciona como una protección a las aplicaciones de los herbicidas mencionados, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional.

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

El algodón GlyTol® LibertyLink® (**GL**) fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614 y LLCotton25. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x LLCotton25 confieren tolerancia a los



herbicidas glifosato (proteína 2mEPSPS) y glufosinato de amonio (proteína PAT/*bar*). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional.

Los análisis bio-informáticos, *Southern Blot* y PCR realizados en los eventos GHB614 y LLCotton25 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 la característica de tolerancia a herbicidas (*2mepsps* y *bar*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón **GL**. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas (promotores, péptidos de tránsito, terminadores) en el algodón **GL**, heredadas de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25 no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

Las proteínas 2mEPSPS y PAT/*bar* 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 la característica de tolerancia a herbicidas otorgue ventajas adaptativas al algodón en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agro-ecosistema. La similitud de las características de las plantas GL 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 **GL**, ni en los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de cruzamiento convencional.

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

Salvo la característica de tolerancia a los herbicidas glifosato (gen *2mepsps*), y glufosinato de amonio (gen *bar*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón GL. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas en el algodón GL (heredadas de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25) no le confieren ninguna característica fenotípica adicional. Este evento de algodón biotecnológico no presenta cambios fenotípicos de significancia biológica comparado con algodón convencional.

Por otro lado, las proteínas citadas 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 la característica de tolerancia a herbicidas otorgue al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas GL 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 evento apilado GL, ni en los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, como consecuencia del proceso de transformación



ni como consecuencia del proceso de apilamiento de las características introducidas mediante cruzamiento convencional, cuando se los compara con el algodón convencional. Por lo tanto, es posible afirmar que, salvo por la tolerancia a herbicidas, el algodón GL es fenotípicamente igual que los algodones convencionales, tanto en México como en otras regiones del mundo.

El evento GL no exhibe ninguna característica fenotípica adicional que pudiese incrementar su supervivencia en hábitats no agrícolas, o en áreas fuera del rango geográfico de la producción de algodón. En el caso poco probable de que se llegasen a formar híbridos entre este evento y parientes silvestres, la introducción de la característica de tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato, a especies en hábitats no agrícolas no conferiría ventaja competitiva alguna, dado que la tecnología funciona como una protección a las aplicaciones de los herbicidas mencionados, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional.

La evaluación agronómica y fenotípica del algodón **GL** 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 2007 (**Cuadro 39**). Los ensayos fueron conducidos de acuerdo con las prácticas de manejo comerciales en cada región algodонера. Cada ensayo consistió de 3 tratamientos con 3 repeticiones 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 **GL** con y sin tratamiento de herbicidas y contraparte convencional.

La elección de las variedades se basó en lo siguiente:

- **Variedad de prueba:** Se selecciono una variedad genéticamente modificada con tecnología GL cuya base genética fue la variedad convencional FM958.
- **Variedad testigo:** Se seleccionó la variedad FM958 por ser la contraparte convencional de las variedades de prueba y con propósitos comparativos.

Cuadro 39. Ubicación de los ensayos de campo para la evaluación agronómica y fenotípica del algodón GL.

No. de ensayo	Población/ Condado	Estado
01	Tift	Georgia
02	Jackson	Arkansas
03	Crittenden	Arkansas
04	Drew	Arkansas
05	Tate	Misisipi
06	Wharton	Texas
07	Wharton	Texas
08	Hockley	Texas



La evaluación agronómica y fenotípica se realizó a través del ciclo del cultivo del algodón con base en los siguientes parámetros:

- Días a emergencia.
- Acame de tallo: 1 = vertical, 9 = gravemente acamado.
- Días a primera flor: como promedio del ensayo.
- Porcentaje de bellotas abiertas promedio visual cuando el parental sea 40–60% de apertura.
- Rendimiento de fibra en lbs. lint/acre.
- Tipo de bellota. 1-9
- Propiedades de fibra (longitud, uniformidad de la longitud, la fuerza, el micronaire, el alargamiento).
- Altura de la planta.
- Nudos totales.
- Altura al Nodo.
- Número total de bellotas.
- Uniformidad de variedad; 1=normal, 2=anormal.
- Morfología de hojas; 1=normal, 2=anormal.
- Morfología de flor; 1=normal, 2=anormal.
- Longitud de fibra.
- Resistencia de la fibra.
- Uniformidad en la longitud de fibra.
- Micronaire.

El resultado del desempeño agronómico se presenta en el [cuadro 40](#), donde se aprecia el promedio de las variables obtenidas de los 8 predios.

Cuadro 40. Resumen de características agronómicas evaluadas en el algodón GL y convencional.

Parametro	FM 958 (a) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL sin tratamiento (b) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL con tratamiento (b) ± SD	SIG **	LSD (0.05)
Nacesncia (plantas/ft)	2.09 + 0.76	2.13 ±0.69	1.98 ±0.68		0.2
Altura de planta (cm)	85.08 ± 11.42	88.83 ± 8.88	88.07 ± 7.99		4.69
Nudos totales	21.33 ±2.97	21.35 ±3.07	21.36 ±3.29		0.48
Altura de Nudo	3.99 ± 0.69	4.16 + 0.68	4.12 + 0.69		0.23
Bellotas totales	12.88 ±6.23	12.21 + 5.50	12.74 + 6.27		1.6
Días a floracion	58.61 + 6.28	58.11 + 7.92	58.17 + 7.93		0.62
Porcentaje de apertura	52.59+ 10.29	49.58 + 12.80*	49.8 + 8.11*	**	2.46
Uniformidad	1.75 ±0.89	1.67 ±0.82	1.79 ±0.98		0.24
Acame	1.21 ±0.5	1.21 ±0.50	1.13 ±0.45		0.09
Tipo de bellota	5.75 ± 2.28	5.79 ±2.30	5.88 ±2.36		0.17



Cuadro 41. Resumen de características de calidad de fibra de algodón GL y convencional.

Parametro	FM 958 (a) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL sin tratamiento (b) ± SD	FM 985 / GlyTol x LL con tratamiento (b) ± SD	SIG **	LSD (0.05)
Rendimiento (Kg/Ha)	834.53 ± 224	796.7 ± 179.37	788.03 ± 181.26		68.85
Longitud de fibra	1.17 ± 0.38	1.17 ± 0.04	1.18 ± 0.04		0.02
Resistencia de la fibra	33.63 + 2.06	33.3 + 2.32	33.38+ 1.85		0.59
Micronaire	4.94 + 0.401	4.76 + 0.41*	4.70 + 0.32*	**	0.2
Uniformidad	84.78+ 14.12	84.72+ 15.02	84.44+ 15.20		0.47

SD= Desviación estaandar

SIG*= Indica una diferencia significativa con el parental

LSD= (Least Significant Difference) Diferencia Mínima Significativa en 0,05

Los resultados indican que los valores de las variables evaluadas en el algodón GL están dentro del rango determinado para las variedades comerciales de referencia (convencionales), lo que demuestra la equivalencia agronómica y fenotípica del algodón GL con relación al algodón convencional (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**⁶⁹).

III.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 GlyTol® LibertyLink®.

El algodón GHB614 x LLCotton25 fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614 y LLCotton25. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x LLCotton25 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato (proteína 2mEPSPS) y glufosinato de amonio (proteína PAT/*bar*). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional.

Las proteínas 2mEPSPS y PAT/*bar*, 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 la característica de tolerancia a herbicidas otorgue ventajas adaptativas al algodón en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agro-ecosistema. La similitud de las características de las plantas **GL** con el algodón convencional permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga o maleza en el algodón **GL** como consecuencia de la modificación genética.

⁶⁹ Trolinder-Wright, L. 2008. Agronomic Performance of Glyphosate and Glufosinate tolerant Cotton based upon stacked events GHB614 x LLCotton25 (GlyTol x LL cotton) In the 2007 USA production season. Bayer CropScience Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38 9052 GENT, Belgium. M-304575-01-1



Las características reproductivas no han sido alteradas en el algodón GlyTol® LibertyLink®, ni en los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, como consecuencia del proceso de transformación ni como consecuencia del proceso de cruzamiento 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), cascarrilla (fibra para ganado vacuno) y *linter* (celulosa para productos industriales y de consumo humano) (www.cottonseed.com⁷⁰). 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 y PAT/*bar* presentes en las variedades de algodón **GL** es muy poco probable y no 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-shikimate-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias. En el algodón **GL** 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, se ha observado 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.*, 2009⁷¹).

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 la proteína PAT/*bar*, ya que las acetiltransferasas no poseen

⁷⁰ National Cottonseed Products Association (NCPA).

⁷¹ Herouet-Guicheney, C.; Rouquié, D.; Freyssinet, M.; Currier, T.; Martone, A.; Zhou, J.; Bates, E.; Ferullo, J.; Hendrickx, K.; Rouan, D. 2009. Safety evaluation of the double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54:143–153.



estabilidad proteolítica o térmica y tiene una alta especificidad de sustrato (Herouet *et al.*, 2005⁷²).

4. 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). 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.

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.
- Crecimiento rápido para llegar al estado reproductivo.
- Período prolongado de producción continúa de semillas.
- Autocompatible, pero no necesariamente auto polinizable o apomítica.
- Si entrecruza utiliza el viento o polinizadores no especializados.
- Gran producción de semillas en condiciones favorables.

⁷² Hérouet, C.; Esdaile, D.J.; Mallyon, B.A.; Debruyne, E.; Schulz, A.; Currier, T.; Hendrickx, K.; van der Klis, R.; Rouan, D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134–149.



- 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.

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

El algodón GlyTol® LibertyLink® expresa las proteínas 2mEPSPS y PAT/*bar* y para la detección de éstas se pueden utilizar métodos de tiras reactivas (LFS), los cuales están disponibles comercialmente para las proteínas por separado, 2mEPSPS⁷³ y PAT/*bar*⁷⁴, o un método comercial multieventos que detecta a ambas proteínas en una misma muestra⁷⁵.

Adicionalmente, a nivel molecular se puede hacer una detección por medio de PCR en tiempo real, en los **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**^{76,77} se presentan los métodos y *primers* específicos para efectuar la reacción de PCR para los eventos GHB614 y LLCotton25.

III.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*.

⁷³ EnviroLogix QuickStix™ QuickStix™ AP Kit for 2mEPSPS Cottonseed. Catalog Number AS084 AP.

⁷⁴ EnviroLogix QuickStix™ QuickStix™ AP Kit for LibertyLink® (bar) Cottonseed. Catalog Number AS013 AP.

⁷⁵ EnviroLogix QuickStix™ QuickStix™ Combo Kit for Multi-Trait Testing Cry1Ab/2Ae/2m/bar Cotton Leaf & Seed. Catalog Number AS059 LS.

⁷⁶ Vanhoutte, N. 2014. Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event GHB614. Protocols PGS0486 + PGS0477. Crop Analytics, Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38 Gent, Belgium. M-346428-03-1.

⁷⁷ Haelterman, S. 2009. Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event LLCotton25. Protocol PGS0327. BioAnalytics, Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38 Gent, Belgium. M-359085-01-1.



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 42).

Cuadro 42. 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 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 homólogos, imposibilitando así la formación de un cigoto fértil por la disparidad de los sistemas genéticos (Stewart, 1995; Wendel *et al.*, 2010; Kantartzi, 2010). Aunado a esta barrera genética se tiene una barrera temporal, esto es, que no se presenta coincidencia en los periodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales, lo cual minimiza el riesgo de flujo de polen entre ellas. 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 debe cumplir con ciertas condiciones: 1) el cultivo y su pariente silvestre deben presentarse en proximidad espacial; 2) sus periodos 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 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 la antesis. El polen de *G. hirsutum* es viable por no más de 24 horas. Cada flor, como la de todos los miembros de Malvaceae, es receptiva únicamente el día en que abre.

Para que sea considerada la posibilidad de hibridación entre algodón cultivado y especies silvestres de *Gossypium* se tiene 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 de manera muy cercana 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 con base en 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 incierta (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 (al menos como progenitores de estas dos especies) que el donador del genoma A es *G. herbaceum* y el donador del genoma D, *G. raimondii* Ulbrich. 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* y *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 entre *G. hirsutum* y *G. barbadense* ha ocurrido desde años atrás (Brubaker *et al.*, 1993; Percy & Wendel, 1990; Brubaker & Wendel, 1994; Wendel & Albert 1992), por tal motivo se presenta un contenido significativo de DNA 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 existen interacciones genéticas desfavorables en ciertos genotipos de híbridos que 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*.

4. Potencial de cruce y transferencia de genes.

Polinización del algodón: El algodón es una planta que se reproduce predominantemente mediante autopolinización, sin embargo se puede presentar algún porcentaje de polinización cruzada cuando existen poblaciones importantes de insectos polinizadores (Llewellyn *et al.*, 2007). La tasa de entrecruzamiento depende de la zona, la estación y del porcentaje de visitación de los insectos polinizadores. No obstante, el nivel de entrecruzamiento puede ser sobrestimado si se consideran sólo los índices de visitantes en las flores de algodón, dado que los potenciales polinizadores buscan preferencialmente los nectarios más que el polen (Moffett *et al.* 1975).

Múltiples estudios de campo realizados en diferentes regiones estiman una tasa de entrecruzamiento del 10% o menos (Meredith & Bridge, 1973; Llewellyn & Fitt 1996; Sen *et al.*, 2004; Van Deynze, *et al.* 2005; Zhang *et al.*, 2005). Se han reportado pocos estudios con altos niveles de entrecruzamiento (Simpson & Duncan, 1956); en estos casos, el porcentaje de entrecruzamiento fue menor (2%) en estudios posteriores realizados en la misma localidad (Meredith & Bridge, 1973).

De manera generalizada, estudios de flujo de polen reportan que la tasa de entrecruzamiento disminuye significativamente cuando se incrementa la distancia. Estos datos pueden representar el rango efectivo de dispersión de polen realizado por los insectos. Experimentos realizados en California muestran una tasa de entrecruzamiento del 7.65% a una distancia de 0.3 m en presencia de polinizadores. Sin embargo, la tasa de entrecruzamiento disminuye de forma significativa (0.67%) al incrementar la distancia a 9 m, aún con la presencia de polinizadores. Para este mismo estudio, en ausencia de insectos que lleven a cabo el flujo de polen, la tasa de entrecruzamiento fue del 4.86% a una corta distancia (0.3 m), disminuyendo significativamente (0.03%) al incrementar la distancia a 1 m (Van Deynze, *et al.* 2005).

Estudios similares realizados durante dos temporadas en Australia, con cultivos de algodón GM rodeado de algodón no GM, muestran valores menores de flujo de polen del cultivo GM al no GM, pero los resultados son consistentes en cuanto al efecto de la distancia sobre la tasa de entrecruzamiento. Durante la primera temporada del estudio, la tasa de entrecruzamiento en presencia de polinizadores fue del 0.15% a 1 m de distancia, mientras que a 4 m la tasa de entrecruzamiento disminuye a menos del 0.08%. Para la segunda temporada, a una distancia de 1 m, la tasa de entrecruzamiento fue del 0.4%, disminuyendo su valor al 0.03% a una distancia de 16 m (Llewellyn & Fitt 1996).



De acuerdo con los estudios arriba mencionados, la tasa de entrecruzamiento depende en gran medida de las condiciones climáticas del sitio de estudio. Esto principalmente por la relación entre las condiciones ambientales y la abundancia de especies de insectos que lleven a cabo el flujo de polen (Llewellyn *et al.*, 2007).

Flujo génico: Las principales zonas de cultivo de algodón se ubican en la región norte y noreste del país, encontrando la mayor extensión de siembra para este cultivo (89,751 ha) en el Estado de Chihuahua (SIAP-SAGARPA, 2015).

Además de *G. hirsutum*, en México se encuentran distribuidas varias especies del género *Gossypium* de las cuales sólo *G. barbadense* es tetraploide, mientras que las demás especies son diploides. Aún cuando *G. hirsutum* presenta altos niveles de autopolinización, existe el potencial de flujo génico si en la zona se presentan poblaciones de *G. hirsutum* convencional o poblaciones de *G. barbadense*, dentro del rango en el cual la polinización cruzada puede efectuarse. No obstante, los niveles de entrecruzamiento reportados son bajos (1 - 2%) y se efectúan a distancias cortas (<30 m), aún en presencia de polinizadores (Van Deynze *et al.*, 2005; Llewellyn & Fitt 1996; Zhang *et al.*, 2005).

Tomando en cuenta lo anterior, la posibilidad de flujo génico entre cultivos experimentales o piloto de algodón GM y cultivos convencionales o poblaciones de *G. barbadense*, es muy baja. Por otra parte, la viabilidad del polen puede ser un factor importante en la reducción del potencial de flujo génico, dado que, además de las características que le impiden un transporte activo por el viento, una vez que se presenta la dehiscencia, no permanece viable por más de 24 horas.

Potencial de maleza: La mayor preocupación para la conversión del algodón en maleza son las plantas voluntarias, sin embargo, éstas pueden ser controladas de manera fácil por rotación de la tierra, labranza y/o utilización de herbicidas de pre- o post-emergencia. Por otro lado, los estudios de equivalencia agronómica muestran que no hay diferencias significativas en las características morfológicas o fenotípicas entre el algodón GM y el algodón convencional, por lo cual se concluye que no hay evidencia que sugiera que el algodón GM pueda convertirse en maleza.

Capacidad Invasiva: No se ha reportado que las variedades cultivables de *G. hirsutum* presenten una capacidad invasiva importante. La hipótesis de que la introducción de genes de resistencia a las principales plagas, podría incrementar el potencial de la capacidad invasiva del algodón GM al modificar su adecuación comparado con variedades convencionales ha sido evaluada con estudios realizados por Eastick & Hearnden (2006) quienes demuestran que la capacidad invasiva, evaluada en términos de germinación, sobrevivencia y dispersión, no presentó diferencias con respecto a su contraparte convencional, aún en zonas con humedad propicia para el establecimiento. Después de 2 años, la sobrevivencia fue muy baja.

Interacción con organismos no blanco: Las proteínas de resistencia a plagas, expresadas a partir de genes *Bt* en cultivos de algodón GM desarrollados a la fecha, están dirigidas a algunos lepidópteros que ocasionan un impacto considerable en el algodón. Existe la posibilidad de interacción con organismos no blanco presentes en los cultivos de algodón, sin embargo, en los diferentes estudios reportados en la literatura científica no han mostrado afectación a organismos no blanco



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

- Aerts, M. 2015. Molecular demonstration of the stability of *Gossypium hirsutum* transformation event LL25 in different backgrounds and over different generations. Bayer CropScience N.V.-Innovation Center Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-208142-02-1.
- 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.
- Brubaker, C., Paterson, A., & Wendel, J. (1999). Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *Genome*, 42, 184-203.
- 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.
- 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.
- Eastick, R., & Hearnden, M. (2006). Potential for weediness of Bt cotton in northern Australia. *Weed Science*, 54(6), 1142-1151.
- 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. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-279396-01-1.
- Habex V. and Leclair M., 2006. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. Bayer BioScience N.V., M-279390-03-1
- Haelterman, S. 2009. Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event LLCotton25. Protocol PGS0327. BioAnalytics, Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38 Gent, Belgium. M-359085-01-1.
- 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.J.; Mallyon, B.A.; Debruyne, E.; Schulz, A.; Currier, T.; Hendrickx, K.; van der Klis, R.; Rouan, D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134–149.
- Hérouet-Guichenev, C.; Rouquié, D.; Freyssinet, M.; Currier, T.; Martone, A.; Zhou, J.; Bates, E.; Ferullo, J.; Hendrickx, K.; Rouan, D. 2009. Safety evaluation of the double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54:143–153.
- Jeffries, T. A. 2013. GHB614 x LLCotton25 – Production and Protein Expression Analyses of Field Grown Samples. USA, 2012. Study Number 12-RSXFT009. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC 27709. M-447807-01-1
- 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.
- 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.



- 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.
- Llewellyn, D., Tyson, C., Constable, G., Duggan, B., Beale, S., & Steel, P. (2007). Containment of regulated genetically modified cotton in the field. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 121, 419-429.
- Llewellyn, D., & Fitt, G. (1996). Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi valley, Australia. *Molecular Breeding*, 2, 157-166.
- Meredith, W., & Bridge, R. (1973). Natural Crossing in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in the Delta of Mississippi. *Crop Science*, 13, 551-552.
- Moens, S. 2010. Stability analysis of cotton combined events GHB614xLLCotton25. Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38. B-9052 Gent. Belgium. M-384909-01-1
- Moens M. and De Beuckeleer M., 2004. Molecular characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event LLCotton25. Bayer Bioscience N.V., M-237709-01-1
- Moffett, J. L.-2. (1975). Moffett, J.O.; Stith, L.S.; Burkhardt, C.C.; Shipman, C.W. *Environmental Entomology*, 4, 203-206.
- 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.
- Palomo, A. (1996). Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Revista Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 4, 359-369.
- 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., 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.
- 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.
- Sen, I., Oglakci, M., Bolek, Y., Cicek, B., Kisakurek, N., & Aydin, S. (2004). Assessing the out-crossing ratio, isolation distance and polliniferous insects in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Asian Journal of Plant Science*, 3, 724-727.
- Simpson, D., & Duncan, E. (1956). Cotton Pollen Dispersal by Insects. *Agronomy Journal*, 48, 305-308.
- 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.
- 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 .
- 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.
- Trolinder-Wright, L. 2008. Agronomic Performance of Glyphosate and Glufosinate tolerant Cotton based upon stacked events GHB614 x LLCotton25 (GlyTol x LL cotton) In the 2007 USA production season. Bayer CropScience Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38 9052 GENT, Belgium. M-304575-01-1
- 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.
- Van Deynze, A., Sundstrom, F., & Bradford, K. (2005). Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity. Crop Sci., 45, 1565–1570.
- Vanhoutte, N. 2014. Real-Time PCR method for event-specific Quantification of cotton GM event GHB614. Protocols PGS0486 + PGS0477. Crop Analytics, Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38 Gent, Belgium. M-346428-03-1.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zhang, B., Pan, X., Guo, T., Wang, Q., & Anderson, T. (2005). Measuring gene flow in the cultivation of transgenic cotton (Gossypium hirsutum L.). Molecular Biotechnology, 31(1), 11-20.



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

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

Las medidas y procedimientos de monitoreo que se indican a continuación tienen el objetivo de asegurar que el algodón GlyTol® LibertyLink® 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.

IV.a.1. Plan de monitoreo detallado

El plan de monitoreo del algodón GlyTol® LibertyLink® 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 conducirá el 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® LibertyLink® se deberá contar con el permiso de liberación al ambiente (PLA), otorgado para la tecnología, en las regiones ecológicas y ciclo agrícola solicitados.

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) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la Dirección General de Impacto y Riesgo Ambiental (DGIRA) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), para realizar ajustes en el protocolo de evaluación, en caso de 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)** y a la **GPS 12.07. Evaluation of Third Parties, Acquisitions, and Countries of Operation (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**. 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 donde 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**. 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.
- 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 SAP⁷⁸.
- 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

⁷⁸ 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.



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 ésta 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**, 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.
 1. Después de que la semilla es ingresada 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 de su ingreso.
 4. Cada vez que se realicen ingresos y salidas de semilla de la 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, dependiendo del tipo de semilla genéticamente modificada o convencional, deberá tener como mínimo los datos que aparecen en la [figura 82](#).
 6. El rótulo anterior ([Figura 82](#)) deberá colocarse a cada uno de los materiales de semillas experimentales existentes en la bodega, con la suficiente protección a fin de que se preserven estos datos durante el tiempo necesario en la bodega.



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyToI® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

Figura 82. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.

 <p style="text-align: center;">Science For A Better Life</p> <p style="text-align: center;">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 style="text-align: center;">SEMILLA GENÉTICAMENTE MODIFICADA</p> <p style="text-align: center;">SEMILLA DE [Cultivo (<i>Nombre científico</i>)] VARIEDAD/ CODIGO:</p> <p>Tecnología: XXXXXXXXXX País de origen: XXXXXXXXXX Evento: XXXXXXXXXX Identificador OCDE: XXXXXXXXXX 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 style="text-align: center;">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> <div style="background-color: red; height: 20px; width: 100%; margin-top: 10px;"></div>	 <p style="text-align: center;">Science For A Better Life</p> <p style="text-align: center;">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 style="text-align: center;">SEMILLA CONVENCIONAL</p> <p style="text-align: center;">SEMILLA DE [Cultivo (<i>Nombre científico</i>)] VARIEDAD/ CÓDIGO:</p> <p>Tecnología: NA País de origen: XXXXXXXXXX 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> <div style="background-color: green; height: 20px; width: 100%; margin-top: 10px;"></div>
--	--

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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.

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 sitio 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® LibertyLink® 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 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**):

- Biotecnología vegetal.
- Características de la tecnología GlyTol® LibertyLink®.
- 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*.

Durante la capacitación se hará un registro de los asistentes y los capacitadores mediante un formato de lista de asistencia (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**). Además, al término de la capacitación, se llevará a cabo una evaluación sobre los temas vistos y se entregarán constancias a los participantes.

El plan de capacitaciones a implementar 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 Enero 2017
<i>Personal asistente de los investigadores</i>	<i>Investigadores responsables y Personal de Asuntos Regulatorios de Bayer.</i>	3ª y 4ª semana de Enero 2017



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

El plan de monitoreo del algodón GlyTol® LibertyLink® 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 región ecológica nivel IV autorizada en el permiso de liberación al ambiente.
- Ubicarse a una distancia mínima de 100 m 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 de los ensayos será realizada por el agricultor cooperante bajo la supervisión del personal de Bayer y el investigador responsable, de acuerdo con la distribución indicada en el croquis del protocolo (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**), 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 43](#) se presenta el manejo agronómico del algodón en el norte de Tamaulipas, desarrollado como parte del paquete tecnológico del cultivo (Loera, Rosales y Reyes 2015).



Cuadro 43. Manejo agronómico del cultivo del algodón en en Tamaulipas Norte⁷⁹.

PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
Preparación del terreno		
Desvare	El desvare se debe efectuar inmediatamente después de la cosecha de cualquier cultivo; en caso del algodón, debe efectuarse el 31 de agosto o antes	El desvare se debe efectuar inmediatamente después de la cosecha de cualquier cultivo; en caso del algodón, debe efectuarse el 31 de agosto o antes
Rotura	Se realiza 2 ó 3 días después del desvare, a 25 - 30 cm de profundidad. Con esto se incorporan los residuos de la cosecha anterior, se expone a las plagas y microorganismos causantes de enfermedades, a la acción de las altas temperaturas de agosto y favorece la aireación del suelo y "cosecha" de agua, y acelera la descomposición de residuos	Se realiza 2 ó 3 días después del desvare, a 25 - 30 cm de profundidad. Con esto se incorporan los residuos de la cosecha anterior, se expone a las plagas y microorganismos causantes de enfermedades, a la acción de las altas temperaturas de agosto y favorece la aireación del suelo y "cosecha" de agua, y acelera la descomposición de residuos
Rastra	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	<p>La mejor época para la siembra de algodón en la región de Tamaulipas Norte es del 15 de febrero al 15 de marzo. La primera semana de marzo se considera la época óptima. Es recomendable realizar la siembra cuando la temperatura del suelo sea de 15 - 18°C y que el pronóstico de las condiciones en los siguientes días sea similar o más cálido.</p> <p>Siembras antes del 15 de febrero, se exponen a bajas temperaturas o heladas tardías y originan el retraso en la germinación y emergencia de las plántulas, además de susceptibilidad a la enfermedad que causa la secadera.</p> <p>En siembras posteriores al 15 de marzo, se incrementan los problemas con plagas y con lluvias en la época de cosecha.</p>	<p>La mejor época para la siembra de algodón en la región de Tamaulipas Norte es del 15 de febrero al 15 de marzo. La primera semana de marzo se considera la época óptima. Es recomendable realizar la siembra cuando la temperatura del suelo sea de 15 - 18°C y que el pronóstico de las condiciones en los siguientes días sea similar o más cálido.</p> <p>Siembras antes del 15 de febrero, se exponen a bajas temperaturas o heladas tardías y originan el retraso en la germinación y emergencia de las plántulas, además de susceptibilidad a la enfermedad que causa la secadera.</p> <p>En siembras posteriores al 15 de marzo, se incrementan los problemas con plagas y con lluvias en la época de cosecha.</p>
Método de siembra	Bajo condiciones de riego, la siembra se realiza sobre el lomo del surco a tierra venida, depositando la semilla a una profundidad de 5 cm. En condiciones de temporal, la siembra se realiza a la misma profundidad en terreno húmedo, ya sea en el lomo del surco o en terreno plano, de acuerdo a la preparación realizada por el productor	Bajo condiciones de riego, la siembra se realiza sobre el lomo del surco a tierra venida, depositando la semilla a una profundidad de 5 cm. En condiciones de temporal, la siembra se realiza a la misma profundidad en terreno húmedo, ya sea en el lomo del surco o en terreno plano, de acuerdo a la preparación realizada por el productor
Densidad de plantas	Bajo condiciones de riego se recomiendan 100,000 plantas/ha. Esto equivale a 8 plantas/m lineal en surcos separados a 81 cm (32 in), y a 9 plantas/m en surcos separados a 92 cm (36 in).	Bajo condiciones de riego se recomiendan 100,000 plantas/ha. Esto equivale a 8 plantas/m lineal en surcos separados a 81 cm (32 in), y a 9 plantas/m en surcos separados a 92 cm (36 in).

⁷⁹ Loera-Gallardo, J.; Rosales-Robles, E.; Reyes-Rosas, M.A. 2015. Guía para Cultivar Algodón en el Norte de Tamaulipas. Campo Experimental Río Bravo, CIR-Noreste-INIFAP.



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
	<p>Bajo condiciones de temporal se recomiendan de 50,000 a 70,000 plantas/ha. Esto equivale a 4 y 5 - 6 plantas/m, en surcos separados a 81 cm y de 4 - 5 y 6.4 plantas/m, en surcos separados a 92 cm.</p>	<p>Bajo condiciones de temporal se recomiendan de 50,000 a 70,000 plantas/ha. Esto equivale a 4 y 5 - 6 plantas/m, en surcos separados a 81 cm y de 4 - 5 y 6.4 plantas/m, en surcos separados a 92 cm.</p>
Riegos	<p>Para asegurar una producción y calidad óptima de algodón se requieren de 45 a 63 cm de agua. La necesidad de agua es mayor al inicio de la floración y durante la etapa de fructificación. Durante este periodo los requerimientos varían de 6 - 10 mm de agua por día.</p> <p>Riego de pre-siembra. Se debe realizar 15 días antes de la siembra, con una lámina de agua de 15 cm.</p> <p>1er riego de auxilio. Se aplica 45 días después de la emergencia del cultivo cuando aparecen los primeros cuadros, con una lámina de agua de 10 cm.</p> <p>2do riego de auxilio. Se aplica 65 días después de la emergencia del cultivo cuando aparecen las primeras flores, con una lámina de agua de 10 cm.</p> <p>3er riego de auxilio. Se aplica 95 días después de la emergencia del cultivo cuando aparecen las primeras bellotas abiertas, con una lámina de agua de 10 cm.</p>	<p>Para asegurar una producción y calidad óptima de algodón se requieren de 45 a 63 cm de agua. La necesidad de agua es mayor al inicio de la floración y durante la etapa de fructificación. Durante este periodo los requerimientos varían de 6 - 10 mm de agua por día.</p> <p>Riego de pre-siembra. Se debe realizar 15 días antes de la siembra, con una lámina de agua de 15 cm.</p> <p>1er riego de auxilio. Se aplica 45 días después de la emergencia del cultivo cuando aparecen los primeros cuadros, con una lámina de agua de 10 cm.</p> <p>2do riego de auxilio. Se aplica 65 días después de la emergencia del cultivo cuando aparecen las primeras flores, con una lámina de agua de 10 cm.</p> <p>3er riego de auxilio. Se aplica 95 días después de la emergencia del cultivo cuando aparecen las primeras bellotas abiertas, con una lámina de agua de 10 cm.</p>
Fertilización	<p>Para mayor eficiencia en la aplicación de fertilizantes, previamente se realiza un análisis de suelo, y con base a los resultados se determina el exceso o las unidades a aplicar de cada elemento.</p> <p>En riego, la dosis óptima de nitrógeno (N) es de 160 unidades/ha y de fósforo (P) es de 60, ya sea en formulación líquida o granular. Para obtener 7.5 pacas/ha es necesario producir 4.25 ton de algodón hueso/ha. Cada 50 unidades de N produce 2.5 pacas.</p> <p>En temporal, la dosis óptima de N es de aproximadamente 120 unidades/ha y de P es de 60, ya sea en formulación líquida o granular.</p> <p>La falta de N reduce la producción y la calidad de fibra, y el exceso, propicia mayor desarrollo vegetativo lo cual provoca retraso en la maduración de fructificaciones, incrementa el desarrollo de enfermedades y riesgo de plagas, además de dificultar la defoliación.</p>	<p>Para mayor eficiencia en la aplicación de fertilizantes, previamente se realiza un análisis de suelo, y con base a los resultados se determina el exceso o las unidades a aplicar de cada elemento.</p> <p>En riego, la dosis óptima de nitrógeno (N) es de 160 unidades/ha y de fósforo (P) es de 60, ya sea en formulación líquida o granular. Para obtener 7.5 pacas/ha es necesario producir 4.25 ton de algodón hueso/ha. Cada 50 unidades de N produce 2.5 pacas.</p> <p>En temporal, la dosis óptima de N es de aproximadamente 120 unidades/ha y de P es de 60, ya sea en formulación líquida o granular.</p> <p>La falta de N reduce la producción y la calidad de fibra, y el exceso, propicia mayor desarrollo vegetativo lo cual provoca retraso en la maduración de fructificaciones, incrementa el desarrollo de enfermedades y riesgo de plagas, además de dificultar la defoliación.</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
Reguladores de crecimiento	<p>El algodón es una planta subtropical perenne que tiene el hábito de crecimiento más complejo de todos los cultivos extensivos. Debido a su hábito indeterminado, ocurren al mismo tiempo en una gran parte de su ciclo, el desarrollo vegetativo y reproductivo, y debe existir un balance adecuado entre ambos tipos de crecimiento para obtener una buena producción de fibra.</p> <p>La decisión de aplicar regulador de crecimiento (cloruro de mepiquat) se basa en factores que determinan el potencial de crecimiento del algodón, como su estado y tasa de desarrollo, retención de frutos, disponibilidad de riego y la fertilización aplicada. Las aplicaciones de cloruro de mepiquat deben anticiparse al crecimiento excesivo del algodón ya que este producto solo actúa sobre la parte de la planta en crecimiento y no reduce el crecimiento ya efectuado, por lo tanto, la etapa de aplicación va desde la aparición del primer cuadro hasta dos semanas después del inicio de la floración, periodo que comprende de 40 a 50 días.</p>	<p>El algodón es una planta subtropical perenne que tiene el hábito de crecimiento más complejo de todos los cultivos extensivos. Debido a su hábito indeterminado, ocurren al mismo tiempo en una gran parte de su ciclo, el desarrollo vegetativo y reproductivo, y debe existir un balance adecuado entre ambos tipos de crecimiento para obtener una buena producción de fibra.</p> <p>La decisión de aplicar regulador de crecimiento (cloruro de mepiquat) se basa en factores que determinan el potencial de crecimiento del algodón, como su estado y tasa de desarrollo, retención de frutos, disponibilidad de riego y la fertilización aplicada. Las aplicaciones de cloruro de mepiquat deben anticiparse al crecimiento excesivo del algodón ya que este producto solo actúa sobre la parte de la planta en crecimiento y no reduce el crecimiento ya efectuado, por lo tanto, la etapa de aplicación va desde la aparición del primer cuadro hasta dos semanas después del inicio de la floración, periodo que comprende de 40 a 50 días.</p>
Control de malezas *	<p>Control de maleza durante el periodo crítico de competencia mediante la aplicación de herbicidas glufosinato de amonio y glifosato, complementado con labores culturales (escardas).</p> <p>Glifosato. Este herbicida controla maleza de hoja ancha y zacates anuales y perennes; se debe aplicar sobre maleza no mayor a 10 cm para evitar su competencia, su aplicación requiere de agua limpia ya que presenta alta adsorción a las partículas de suelo. El sulfato de amonio al 2 % incrementa la acción de este herbicida al impedir que las sales disueltas en el agua lo inactiven. Se recomienda esperar al menos 7 días después de la aplicación del glifosato para laborar el suelo. Comúnmente es necesario realizar dos aplicaciones debido a que el glifosato no tiene actividad en el suelo.</p> <p>Glufosinato de amonio. Este herbicida controla maleza de hojas anchas y zacates anuales; se recomienda aplicar sobre maleza no mayor a 10 cm, ya que la acción del glufosinato es principalmente de contacto. Este herbicida se puede aplicar desde la emergencia hasta la floración del algodón. Se debe esperar 7 días después de la aplicación del glufosinato para laborar el suelo. Comúnmente es necesario realizar dos aplicaciones ya que glufosinato no tiene actividad en el suelo.</p> <p>Es necesario mantener libre de maleza al algodón durante sus primeros 60 días de desarrollo, para obtener su máximo rendimiento. El periodo crítico</p>	<p>Es necesario mantener libre de maleza al algodón durante sus primeros 60 días de desarrollo, para obtener su máximo rendimiento. El periodo crítico de competencia de maleza anual en algodón se presenta en los primeros 50 - 60 días después de la emergencia del cultivo, y reduce el rendimiento de 30 - 50% en relación al testigo sin maleza. Es recomendable mantener un buen control de maleza durante todo el ciclo del cultivo, con el fin de obtener una fibra libre de impurezas ya que la cosecha se realiza en forma mecánica.</p> <p>El control mecánico incluye los deshierbes manuales. En sistemas de labranza convencional el control mecánico de maleza incluye la labranza primaria o preparación del terreno mediante arado, subsuelo y rastra, y la labranza secundaria como la siembra y el paso de escardas. Además el sistema de siembra en húmedo o a "tierra venida" elimina la primera generación de maleza y permite establecer los cultivos en suelo sin maleza. Posteriormente el paso de escardas con cultivadora rotativa (<i>lilliston</i>) o de picos (<i>sweeps</i>), elimina a la maleza a la vez que ayuda al "aporque" del cultivo y facilita la conducción del agua de riego.</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
	<p>de competencia de maleza anual en algodón se presenta en los primeros 50 - 60 días después de la emergencia del cultivo, y reduce el rendimiento de 30 - 50% en relación al testigo sin maleza. Es recomendable mantener un buen control de maleza durante todo el ciclo del cultivo, con el fin de obtener una fibra libre de impurezas ya que la cosecha se realiza en forma mecánica.</p> <p>El control mecánico incluye los deshierbes manuales. En sistemas de labranza convencional el control mecánico de maleza incluye la labranza primaria o preparación del terreno mediante arado, subsuelo y rastra, y la labranza secundaria como la siembra y el paso de escardas. Además el sistema de siembra en húmedo o a "tierra venida" elimina la primera generación de maleza y permite establecer los cultivos en suelo sin maleza. Posteriormente el paso de escardas con cultivadora rotativa (<i>lilliston</i>) o de picos (<i>sweeps</i>), elimina a la maleza a la vez que ayuda al "aporque" del cultivo y facilita la conducción del agua de riego.</p>	<p>Control químico</p> <p>a) Control de maleza en pre-siembra.</p> <p>El glifosato (1000 g i.a./ha) y el paraquat (600 g i.a./ha) son los herbicidas comúnmente aplicados en esta época; estos herbicidas no son selectivos y no dejan residuos en el suelo, lo que hace posible su uso sin afectar a los cultivos sembrados posteriormente. El paraquat es un herbicida de contacto, para el control de maleza anual; su aplicación requiere de agua limpia ya que presenta alta adsorción a las partículas de suelo. El glifosato es sistémico, para el control de maleza anual y perenne; su aplicación requiere de agua limpia ya que presenta alta adsorción a las partículas de suelo. El sulfato de amonio al 2 % incrementa la acción de este herbicida al impedir que las sales disueltas en el agua inactiven al herbicida.</p> <p>El herbicida 2,4-D amina (480 g i.a. /ha), controla malezas anuales y perennes de hoja ancha. Es un herbicida sistémico, que puede mezclarse con glifosato para el control de maleza antes de la siembra. Esta mezcla es especialmente útil para el control de oreja de ratón y trompillo. La siembra de algodón debe esperar al menos 60 días después de la aplicación del 2,4-D.</p> <p>Para el control de zacates anuales en pre-siembra, se recomiendan herbicidas que generalmente requieren incorporación mecánica al suelo para situarse en los primeros 5 a 10 cm de profundidad y evitar su degradación por la luz o su volatilización. Para este caso la trifluralina y la pendimetalina son de amplio uso en el cultivo del algodón.</p> <p>Los herbicidas trifluralina (580 - 1160 g i.a./ha) o pendimetalina (1400 g i.a./ha), controlan malezas de hoja de semilla pequeña como quelites, chuales y verdolaga. Deben aplicarse antes de la siembra e incorporarse mecánicamente con un paso de rastra o cultivadora rotativa. Deben aplicarse sobre suelo mullido para permitir una buena distribución del herbicida. Se recomienda incorporar inmediatamente ya que en 24 horas puede perderse hasta 30 % del producto aplicado por degradación por luz. Se sugiere ajustar las dosis de acuerdo a la textura del suelo, dosis bajas en suelos arenosos y dosis altas en suelos arcillosos.</p> <p>El herbicida dimetenamida (900 - 1300 g i.a./ha) controla zacates anuales, quelites y verdolaga. Las dosis varían con la textura de suelo y su</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
		<p>contenido de materia orgánica. Use dosis bajas en suelos con contenido de materia orgánica menor a 3% y dosis altas en suelos arcillosos o con contenido de materia orgánica mayor a 3%. No cultive por 30 días después de la aplicación para evitar reducir la actividad del herbicida. La dimetenamida no deja residuos en el suelo que impidan la siembra de cultivos al siguiente ciclo agrícola.</p> <p>El herbicida acetoclor (3150 g i.a./ha) controla coquillo amarillo. Las dosis varían con la textura de suelo y su contenido de materia orgánica: mayor dosis en suelos arcillosos o con mayor materia orgánica. Un período de cuatro semanas sin lluvia después de la aplicación reduce su actividad. Los cereales de grano pequeño pueden ser sembrados tres meses después de la aplicación de acetoclor.</p> <p>b) Control pre-emergente de maleza anual de hoja ancha.</p> <p>Se aplican después de la siembra, pero antes de emerger la maleza y el algodón, requieren de un riego o precipitación en los primeros 10 días, o bien incorporación mecánica con una paso de cultivadora rotativa si no ocurre lluvia, después de su aplicación para situarse en los primeros 5 cm de profundidad del suelo, donde germina la mayor parte de la semilla de maleza.</p> <p>El herbicida diuron (880 - 1200 g i.a./ha) se aplica después de la siembra y antes que emerja el cultivo. Se puede aplicar en una banda de 30 a 40 cm sobre la hilera de plantas y complementar el control con escardas. Las dosis se deben ajustar de acuerdo a la textura de suelo y su contenido de materia orgánica: mayor dosis en suelos arcillosos o con mayor materia orgánica. Se puede realizar una segunda aplicación en forma dirigida cuando el algodono tenga de 30 cm de altura y antes de que cierre el cultivo.</p> <p>El herbicida fluometuron (1100 - 1800 g i.a./ha) controla hojas anchas. Las dosis se deben ajustar de acuerdo a la textura del suelo y su contenido de materia orgánica: mayor dosis en suelos arcillosos o con mayor materia orgánica. Debe aplicarse después de la siembra y antes que emerja el cultivo. Se puede aplicar en post-emergencia dirigida, evitando el contacto con las hojas del algodón.</p> <p>c) Control post-emergente de maleza de hoja ancha.</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
		<p>Si la maleza se presenta cuando los cultivos ya están establecidos es común que se requiera la aplicación de herbicidas post-emergentes. En la mayoría de los casos, la aplicación de estos herbicidas debe realizarse sobre maleza en sus primeros estados de desarrollo (2 a 4 hojas) cuando es más susceptible a los herbicidas y su competencia es mínima.</p> <p>El herbicida pirithiobac sodio (100 g i.a./ha) muestra un excelente control de la mayoría de las malezas de hoja ancha, excepto las solanáceas. Se sugiere aplicar cuando el algodono tenga de una hoja verdadera hasta 60 días antes de la cosecha, pero siempre sobre maleza menor de 10 cm de altura. Requiere surfactante al 0.25 % v/v. No se mezcle con el insecticida malation pues la selectividad al algodono se reduce. Muestra antagonismo con herbicidas graminicidas, por lo que debe aplicarse de 5 a 7 días antes o después de estos productos. Es necesario verificar lo concerniente a la rotación de cultivos en la etiqueta del producto</p> <p>d) Control post-emergente de zacates.</p> <p>Los herbicidas fluazifop-p-butil (625 g i.a./ha), quizalofop-p-etil (73 g i.a./ha), clethodim (180 g i.a./ha) y setoxidim (552 g i.a./ha) deben aplicarse sobre zacates sin amacollar, en crecimiento activo y en suelo con buena humedad. Utilice la dosis mayor en zacates perennes. Agregue aceite agrícola a 1 % v/v o surfactante a 0.25 % v/v. No realice escardas 7 días antes y después de la aplicación.</p>
Control de plagas		
Insectos lepidópteros	Aplicación de insecticidas.	Aplicación de insecticidas.
Otras plagas (trips, chinches, mosquita blanca, picudo, etc.)	<p>Pulga saltona</p> <p>Es una plaga importante cuando se inicia la producción de cuadros. Los primeros cuadros que se producen, contribuyen substancialmente al rendimiento, así como a la realización de una cosecha temprana. Este insecto causa que la planta de algodón se retrase en el “amarre” de fructificaciones, y como consecuencia, la época de cosecha se alarga.</p> <p>El daño es causado por las ninfas y los adultos. Su ciclo de vida de huevo a adulto dura dos semanas y puede haber seis generaciones al año. Incrementa sus poblaciones en la maleza como trompillo, verdolaga, salvia y amapola silvestre. Una planta infestada por pulga saltona se caracteriza por desarrollar una ramificación</p>	<p>Pulga saltona</p> <p>Es una plaga importante cuando se inicia la producción de cuadros. Los primeros cuadros que se producen, contribuyen substancialmente al rendimiento, así como a la realización de una cosecha temprana. Este insecto causa que la planta de algodón se retrase en el “amarre” de fructificaciones, y como consecuencia, la época de cosecha se alarga.</p> <p>El daño es causado por las ninfas y los adultos. Su ciclo de vida de huevo a adulto dura dos semanas y puede haber seis generaciones al año. Incrementa sus poblaciones en la maleza como trompillo, verdolaga, salvia y amapola silvestre. Una planta infestada por pulga saltona se caracteriza por desarrollar una ramificación</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
	<p>excesiva, un menor crecimiento de las ramas fructíferas y finalmente sólo produce unas cuantas bellotas.</p> <p>Muestreo. Iniciarlo a la formación de los primeros cuadros, y continuarlo hasta después de dos semanas que ocurrió la máxima formación de cuadros y que la mayoría de las bellotas están "amarradas". Se recomienda revisar las terminales dado que el 65% de los adultos y 78% de las ninfas se encuentran en estos sitios.</p> <p>De 15 - 25 adultos y ninfas en 100 terminales durante las primeras 3 semanas de "cuadreo" causan daño económico. Posteriormente, a medida que la planta se desarrolla e incrementa su producción de frutos, poblaciones mayores de este insecto rara vez causan daño económico.</p> <p>Oxamyl (470 g i.a./ha), acefate (300 g i.a./ha), dimetoato (400 g i.a./ha).</p> <p>Chinches pequeñas.</p> <p>Es un grupo compuesto por la chinche lygus, y la chinche <i>Creontiades</i> spp; requieren de 3 - 4 semanas para completar su ciclo hasta adulto; ovipositan de 50 a 150 huevos depositándolos en las flores, cuadros, brácteas y tallos. Los huevos eclosionan en 11 días.</p> <p>Al inicio de la infestación son abundantes en los márgenes de las parcelas, adyacentes a otras parcelas de plantas hospederas como el maíz, sorgo y otras, de donde migran al algodón. Generalmente se alimentan de los cuadros antes y después de la floración y si la infestación persiste, causan daño a las bellotas. Su daño provoca el desprendimiento de cuadros, y bellotas pequeñas. El más importante periodo de susceptibilidad de la planta es durante las primeras tres semanas de producción de cuadros, siendo la primera semana la más crítica. Ante la presencia de altas poblaciones de chinches, la remoción de frutos puede ser excesiva y de importancia económica. Ocasionalmente, los cuadros y bellotas dañadas pueden permanecer en las plantas pero su daño será evidente en la flor y la apertura de las bellotas será irregular y mostrara daño en la fibra.</p> <p>Muestreo. La necesidad de aplicar medidas de control contra estas chinches es determinada por su abundancia, en relación con la producción de frutos. Es recomendable inspeccionar las parcelas a intervalos de 4 - 5 días, durante las primeras seis semanas de producción de cuadros. Por el</p>	<p>excesiva, un menor crecimiento de las ramas fructíferas y finalmente sólo produce unas cuantas bellotas.</p> <p>Muestreo. Iniciarlo a la formación de los primeros cuadros, y continuarlo hasta después de dos semanas que ocurrió la máxima formación de cuadros y que la mayoría de las bellotas están "amarradas". Se recomienda revisar las terminales dado que el 65% de los adultos y 78% de las ninfas se encuentran en estos sitios.</p> <p>De 15 - 25 adultos y ninfas en 100 terminales durante las primeras 3 semanas de "cuadreo" causan daño económico. Posteriormente, a medida que la planta se desarrolla e incrementa su producción de frutos, poblaciones mayores de este insecto rara vez causan daño económico.</p> <p>Oxamyl (470 g i.a./ha), acefate (300 g i.a./ha), dimetoato (400 g i.a./ha).</p> <p>Chinches pequeñas.</p> <p>Es un grupo compuesto por la chinche lygus, y la chinche <i>Creontiades</i> spp; requieren de 3 - 4 semanas para completar su ciclo hasta adulto; ovipositan de 50 a 150 huevos depositándolos en las flores, cuadros, brácteas y tallos. Los huevos eclosionan en 11 días.</p> <p>Al inicio de la infestación son abundantes en los márgenes de las parcelas, adyacentes a otras parcelas de plantas hospederas como el maíz, sorgo y otras, de donde migran al algodón. Generalmente se alimentan de los cuadros antes y después de la floración y si la infestación persiste, causan daño a las bellotas. Su daño provoca el desprendimiento de cuadros, y bellotas pequeñas. El más importante periodo de susceptibilidad de la planta es durante las primeras tres semanas de producción de cuadros, siendo la primera semana la más crítica. Ante la presencia de altas poblaciones de chinches, la remoción de frutos puede ser excesiva y de importancia económica. Ocasionalmente, los cuadros y bellotas dañadas pueden permanecer en las plantas pero su daño será evidente en la flor y la apertura de las bellotas será irregular y mostrara daño en la fibra.</p> <p>Muestreo. La necesidad de aplicar medidas de control contra estas chinches es determinada por su abundancia, en relación con la producción de frutos. Es recomendable inspeccionar las parcelas a intervalos de 4 - 5 días, durante las primeras seis semanas de producción de</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
	<p>tipo de insecto y su comportamiento, el muestreo debe realizarse mediante redazos utilizando una red de 40 cm de diámetro.</p> <p>Durante el periodo previo a floración, en cada uno de cuatro sitios, efectuar 50 redazos en la porción superior de plantas en un mismo surco. Una medida de control debe ser aplicada cuando encuentre 20 - 30 ninfas o adultos en cada 50 redazos.</p> <p>Otras recomendaciones de muestreo antes de floración indican que es necesaria una medida de control al encontrar 5 chinches en 100 terminales, y el 20-25 % de los cuadros dañados; después de floración, el control es requerido cuando se encuentren 15 chinches en 100 terminales.</p> <p>Chinches manchadoras.</p> <p>Grupo constituido por la chinche verde, la chinche café, la chinche sureña y la chinche conchuela.</p> <p>El ciclo de vida de las chinches manchadoras es muy similar al de las chinches pequeñas, requieren de 3 - 4 semanas para completar su ciclo hasta adulto. Ovipositan de 20 a 100 huevos en el envés de las hojas. Los huevos eclosionan en 11 días.</p> <p>Las chinches manchadoras pueden estar presentes antes de la floración y atacar cuadros pero el impacto de su daño es mayor en las bellotas durante la época reproductiva. Su daño causa la caída de cuadros y bellotas pequeñas, ésta pérdida significa retraso en el “amarre” de frutos, retraso en la cosecha y reducción de rendimiento. La penetración del estilete de las chinches en las bellotas, para alimentarse de las semillas en formación, además de causar un daño directo, favorece el crecimiento de hongos que manchan la fibra en desarrollo y algunas veces cuando la bellota abre, la fibra afectada permanece endurecida. Este mismo efecto en la fibra puede ocurrir también por el crecimiento de hongos cuando la lluvia coincide con la apertura de la bellota.</p> <p>Muestreo. Revise plantas en 2 m de surco en diversos sitios de la parcela, y examine bellotas de 2 cm de diámetro, en varios sitios; cuando encuentre un promedio de una o más chinches manchadoras/2 m de surco y al abrir las bellotas el 20% de ellas muestran protuberancias internas o manchas en la fibra por efecto de la alimentación de chinches, es necesario aplicar medidas de control.</p>	<p>cuadros. Por el tipo de insecto y su comportamiento, el muestreo debe realizarse mediante redazos utilizando una red de 40 cm de diámetro.</p> <p>Durante el periodo previo a floración, en cada uno de cuatro sitios, efectuar 50 redazos en la porción superior de plantas en un mismo surco. Una medida de control debe ser aplicada cuando encuentre 20 - 30 ninfas o adultos en cada 50 redazos.</p> <p>Otras recomendaciones de muestreo antes de floración indican que es necesaria una medida de control al encontrar 5 chinches en 100 terminales, y el 20-25 % de los cuadros dañados; después de floración, el control es requerido cuando se encuentren 15 chinches en 100 terminales.</p> <p>Chinches manchadoras.</p> <p>Grupo constituido por la chinche verde, la chinche café, la chinche sureña y la chinche conchuela.</p> <p>El ciclo de vida de las chinches manchadoras es muy similar al de las chinches pequeñas, requieren de 3 - 4 semanas para completar su ciclo hasta adulto. Ovipositan de 20 a 100 huevos en el envés de las hojas. Los huevos eclosionan en 11 días.</p> <p>Las chinches manchadoras pueden estar presentes antes de la floración y atacar cuadros pero el impacto de su daño es mayor en las bellotas durante la época reproductiva. Su daño causa la caída de cuadros y bellotas pequeñas, ésta pérdida significa retraso en el “amarre” de frutos, retraso en la cosecha y reducción de rendimiento. La penetración del estilete de las chinches en las bellotas, para alimentarse de las semillas en formación, además de causar un daño directo, favorece el crecimiento de hongos que manchan la fibra en desarrollo y algunas veces cuando la bellota abre, la fibra afectada permanece endurecida. Este mismo efecto en la fibra puede ocurrir también por el crecimiento de hongos cuando la lluvia coincide con la apertura de la bellota.</p> <p>Muestreo. Revise plantas en 2 m de surco en diversos sitios de la parcela, y examine bellotas de 2 cm de diámetro, en varios sitios; cuando encuentre un promedio de una o más chinches manchadoras/2 m de surco y al abrir las bellotas el 20% de ellas muestran protuberancias internas o manchas en la fibra por efecto de la alimentación de chinches, es necesario aplicar</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
	<p>Otras recomendaciones indican la aplicación de medidas de control cuando se encuentren 4 - 5 adultos o ninfas en 100 redazos.</p> <p>Oxamyl (470 g i.a./ha); acefate (300 g i.a./ha), dimetoato (400 g i.a./ha).</p> <p>Picudo.</p> <p>Es la plaga más importante del algodón en la región de Tamaulipas Norte; su control representa hasta el 30% del costo de inversión. Daña cuadros, flores y bellotas; los adultos se pueden observar fácilmente en las flores alimentándose de polen.</p> <p>El picudo hibernante emerge durante el mes de marzo. Cuando infesta al cultivo y aún no hay fructificaciones, no necesita ser controlado.</p> <p>Cuando se observan picudos en los primeros cuadros, se sugiere aplicar insecticida en los márgenes de la parcela; esto retrasará el incremento de su población, y consecuentemente, su presencia posterior ocurrirá en generaciones más definidas en tiempo y se facilitará su control.</p> <p>En apoyo al manejo del picudo, existe una Campaña de Erradicación financiada por los Gobiernos Federal y Estatal y los productores, y es conducida por la Junta Local de Sanidad Vegetal, aplicando malatión a ultra bajo volumen en parcelas de algodón donde se capturan picudos en trampas.</p> <p>Para ovipositar la hembra prefiere cuadros de un tercio de desarrollo (0.5 cm de diámetro), los cuadros atacados presentan sus brácteas abiertas. Cada hembra puede poner hasta 200 huevos en un periodo de un mes; también oviposita en bellotas pequeñas. El ciclo completo de huevo a adulto puede durar 16 o más días, y se presentan 7 generaciones al año.</p> <p>Muestreo: Realizarlo cada tercer día durante la época de formación de los primeros cuadros, posteriormente, el muestreo debe ser semanal. Se debe aplicar insecticida cuando se encuentre el 10% de cuadros o el 5% de bellotas dañadas.</p> <p>Control: Los insecticidas son la única alternativa para el control de este insecto. Un control satisfactorio depende de la combinación de métodos culturales y químicos. Esto incluye la selección de variedades de ciclo corto y la siembra temprana, para escapar a las altas</p>	<p>medidas de control.</p> <p>Otras recomendaciones indican la aplicación de medidas de control cuando se encuentren 4 - 5 adultos o ninfas en 100 redazos.</p> <p>Oxamyl (470 g i.a./ha); acefate (300 g i.a./ha), dimetoato (400 g i.a./ha).</p> <p>Picudo.</p> <p>Es la plaga más importante del algodón en la región de Tamaulipas Norte; su control representa hasta el 30% del costo de inversión. Daña cuadros, flores y bellotas; los adultos se pueden observar fácilmente en las flores alimentándose de polen.</p> <p>El picudo hibernante emerge durante el mes de marzo. Cuando infesta al cultivo y aún no hay fructificaciones, no necesita ser controlado.</p> <p>Cuando se observan picudos en los primeros cuadros, se sugiere aplicar insecticida en los márgenes de la parcela; esto retrasará el incremento de su población, y consecuentemente, su presencia posterior ocurrirá en generaciones más definidas en tiempo y se facilitará su control.</p> <p>En apoyo al manejo del picudo, existe una Campaña de Erradicación financiada por los Gobiernos Federal y Estatal y los productores, y es conducida por la Junta Local de Sanidad Vegetal, aplicando malatión a ultra bajo volumen en parcelas de algodón donde se capturan picudos en trampas.</p> <p>Para ovipositar la hembra prefiere cuadros de un tercio de desarrollo (0.5 cm de diámetro), los cuadros atacados presentan sus brácteas abiertas. Cada hembra puede poner hasta 200 huevos en un periodo de un mes; también oviposita en bellotas pequeñas. El ciclo completo de huevo a adulto puede durar 16 o más días, y se presentan 7 generaciones al año.</p> <p>Muestreo: Realizarlo cada tercer día durante la época de formación de los primeros cuadros, posteriormente, el muestreo debe ser semanal. Se debe aplicar insecticida cuando se encuentre el 10% de cuadros o el 5% de bellotas dañadas.</p> <p>Control: Los insecticidas son la única alternativa para el control de este insecto. Un control satisfactorio depende de la combinación de métodos culturales y químicos. Esto incluye la</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
	<p>poblaciones de picudo que se producen durante los meses de junio, julio y agosto; la aplicación de un defoliante para acelerar la cosecha, facilitar la destrucción de residuos y eliminar la fuente de alimento para los adultos potenciales de entrar en hibernación.</p> <p>Ante la presencia de picudo, la primera aplicación de insecticida debe realizarse hasta que los primeros cuadros alcanzan 1/3 de su tamaño; la segunda, debe aplicarse a los 3 - 5 días después en caso de que los picudos se dispersen al interior de la parcela. Los insecticidas recomendados son: malation (1000 g i.a./ha), metomilo (290 g i.a./ha), paratión metílico (720 g i.a./ha), endosulfan (700 g i.a./ha).</p>	<p>selección de variedades de ciclo corto y la siembra temprana, para escapar a las altas poblaciones de picudo que se producen durante los meses de junio, julio y agosto; la aplicación de un defoliante para acelerar la cosecha, facilitar la destrucción de residuos y eliminar la fuente de alimento para los adultos potenciales de entrar en hibernación.</p> <p>Ante la presencia de picudo, la primera aplicación de insecticida debe realizarse hasta que los primeros cuadros alcanzan 1/3 de su tamaño; la segunda, debe aplicarse a los 3 - 5 días después en caso de que los picudos se dispersen al interior de la parcela. Los insecticidas recomendados son: malation (1000 g i.a./ha), metomilo (290 g i.a./ha), paratión metílico (720 g i.a./ha), endosulfan (700 g i.a./ha).</p>
<p>Manejo de enfermedades</p>	<p>En las primeras etapas de desarrollo se presenta la secadera temprana ocasionada por el hongo <i>Rhizoctonia</i>. Esta enfermedad se previene evitando la siembra de algodón bajo condiciones de temperatura debajo de 18 °C. Esta condición se presenta generalmente antes del 15 de febrero.</p> <p>La pudrición texana, se manifiesta generalmente durante la época de floración y es ocasionada por un hongo, el cual ataca al sistema radicular, llegando a causar la muerte de la planta. En terrenos con presencia de este hongo, la siembra de gramíneas puede reducirlo gradualmente.</p>	<p>En las primeras etapas de desarrollo se presenta la secadera temprana ocasionada por el hongo <i>Rhizoctonia</i>. Esta enfermedad se previene evitando la siembra de algodón bajo condiciones de temperatura debajo de 18 °C. Esta condición se presenta generalmente antes del 15 de febrero.</p> <p>La pudrición texana, se manifiesta generalmente durante la época de floración y es ocasionada por un hongo, el cual ataca al sistema radicular, llegando a causar la muerte de la planta. En terrenos con presencia de este hongo, la siembra de gramíneas puede reducirlo gradualmente.</p>
<p>Cosecha</p>		
<p>Defoliación</p>	<p>La defoliación química eficiente del algodón tiene un gran impacto en el rendimiento y calidad de la fibra cosechada, además de tener muchos beneficios entre los que destacan una mayor eficiencia de cosecha, eliminación de basura y manchado en la fibra del algodón cosechado, desecación más rápida del rocío en las plantas que permite más horas de cosecha por día, el incremento en la apertura de bellotas y la reducción en la pudrición de bellotas.</p> <p>Los defoliantes funcionan mejor en un algodón maduro bajo temperaturas cálidas y condiciones húmedas y soleadas. Existen varios criterios para determinar el tiempo adecuado para efectuar la defoliación, siendo el más importante el porcentaje de bellotas abiertas.</p> <p>Porcentaje de bellotas abiertas.</p> <p>Para una defoliación efectiva las aplicaciones se deben realizar en un clima cálido y soleado, en suelo con bajos niveles de nitrógeno y humedad, algodón sin estrés pero con pocas hojas jóvenes</p>	<p>La defoliación química eficiente del algodón tiene un gran impacto en el rendimiento y calidad de la fibra cosechada, además de tener muchos beneficios entre los que destacan una mayor eficiencia de cosecha, eliminación de basura y manchado en la fibra del algodón cosechado, desecación más rápida del rocío en las plantas que permite más horas de cosecha por día, el incremento en la apertura de bellotas y la reducción en la pudrición de bellotas.</p> <p>Los defoliantes funcionan mejor en un algodón maduro bajo temperaturas cálidas y condiciones húmedas y soleadas. Existen varios criterios para determinar el tiempo adecuado para efectuar la defoliación, siendo el más importante el porcentaje de bellotas abiertas.</p> <p>Porcentaje de bellotas abiertas.</p> <p>Para una defoliación efectiva las aplicaciones se deben realizar en un clima cálido y soleado, en suelo con bajos niveles de nitrógeno y humedad, algodón sin estrés pero con pocas hojas jóvenes</p>



PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	GLYTOL® LIBERTYLINK®	CONVENCIONAL
	y con 60 a 70% de bellotas abiertas. Defoliantes. Tribufos (1080 - 1440 g i.a./ha), thidiazuron (50 - 120 g i.a./ha), carfentrazone (24 - 36 g i.a./ha) Productos para promover la apertura de bellotas. Ethephon (720 - 1080 g i.a./ha), ethephon + ciclanilida (1.2 - 2.0 kg i.a/ha)	y con 60 a 70% de bellotas abiertas. Defoliantes. Tribufos (1080 - 1440 g i.a./ha), thidiazuron (50 - 120 g i.a./ha), carfentrazone (24 - 36 g i.a./ha) Productos para promover la apertura de bellotas. Ethephon (720 - 1080 g i.a./ha), ethephon + ciclanilida (1.2 - 2.0 kg i.a/ha)
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 cosecha de cualquier cultivo; en caso del algodón, debe efectuarse el 31 de agosto o antes	El desvare se debe efectuar inmediatamente después de la cosecha de cualquier cultivo; en caso del algodón, debe efectuarse el 31 de agosto o antes

* Estas son las únicas prácticas agronómicas del algodón GlyTol® LibertyLink® que difieren del algodón convencional.

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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.

2.3. Evaluación de la tecnología.

Durante el ensayo se evaluarán las variables descritas en el protocolo de ensayo experimental (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**) referentes a fenología y efectividad de los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.



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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.

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® LibertyLink® 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.

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.

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

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/o 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 (ANEXO 46 INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.

IV.b. Medidas y procedimientos de bioseguridad

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

La semilla de algodón a utilizar en la siembra del ensayo será transportada, almacenada y manejada de acuerdo a lo establecido en los documentos:

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Posterior a la importación, la semilla será resguardada en el almacén de Bayer ubicado en la siguiente dirección:

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Figura 83. Almacén de Bayer de México ubicado en Delicias, Chih.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL



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 84. Condiciones de almacenamiento y seguridad del almacén.





Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

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>	País de origen: <u>XXXXXXXXXX</u>
Evento:	Contenido neto (kg):
Identificador OCDE: <u>XXXXXXXXXX</u>	

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 (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

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.

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

Los sitios de liberación se establecerán en zonas donde 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 para 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 & Fester, 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.

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

El algodón GlyTol® LibertyLink® será sembrado exclusivamente en los sitios de liberación autorizados en el permiso de liberación al ambiente correspondiente, 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.

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

El sitio experimental de algodón GlyTol® LibertyLink® 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.



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

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 **GL** 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 una liberación no intencional fuera de las áreas de siembra autorizada:

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

En adición a la característica de tolerancia a herbicidas (*2mepsps* y *bar*), ninguna otra característica se ha incorporado como producto de la modificación genética del algodón **GL** (sección I). Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas (promotores, péptidos de tránsito, terminadores) en el algodón **GL**, heredadas de los eventos individuales GHB614 y LLCotton25 no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

Las proteínas 2mEPSPS y PAT/*bar* 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 la característica de tolerancia a herbicidas otorgue ventajas adaptativas al algodón en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agro-ecosistema. La similitud de las características de las plantas **GL** con el algodón convencional nos permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga o maleza en el algodón GL como consecuencia de la modificación genética (sección I).

Las características reproductivas no han sido alteradas en el algodón **GL**, ni en los eventos individuales GHB614 y LLCotton25, 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 y LLCotton25.

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) y LLCotton25 (LibertyLink®), componentes del algodón GlyTol® LibertyLink® y determinó que el algodón que contiene estos eventos no representa 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 organismos 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) y LLCotton25 (2003)

En México, el algodón GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25), cuenta con la autorización **No. 093300CO041536 de fecha 20 de enero de 2010 (COF - 10989)**, expedida por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la cual determinó que el algodón GL es equivalente sustancialmente a su contraparte convencional y puede ser



usado como pienso para alimentación en animales y subproductos para alimentación humana (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

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 **GL** 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.*, 2009⁸⁰).

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

⁸⁰ Herouet-Guicheney, C.; Rouquié, D.; Freyssinet, M.; Currier, T.; Martone, A.; Zhou, J.; Bates, E.; Ferullo, J.; Hendrickx, K.; Rouan, D. 2009. Safety evaluation of the double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54:143–153.



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.

5.5. 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.*, 2005⁸¹).

IV.b.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 PROVOMENTE.

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

El país de origen del algodón GlyTol® LibertyLink® (GL) es los Estados Unidos de América y cuenta con autorización para su comercialización bajo es estatus de no-regulado desde el 16 de diciembre de 2002 para el evento LibertyLink® (LLCotton25) y del 22 de mayo de 2009 para el evento GlyTol® (BCS-GHØØ2-5). 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*.

⁸¹ Hérouet, C.; Esdaile, D.J.; Mallyon, B.A.; Debruyne, E.; Schulz, A.; Currier, T.; Hendrickx, K.; van der Klis, R.; Rouan, D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134–149.



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 85). 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 productoras 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 44).

Los principales tipos climáticos que atraviesan la franja algodонера son clima húmedo subtropical (Cfa), clima semiárido (BSk) y clima desértico (BWh) (Figura 86).

Cuadro 44. 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>).

Figura 85. Regiones productoras de algodón de los Estados Unidos (*Cotton belt*).

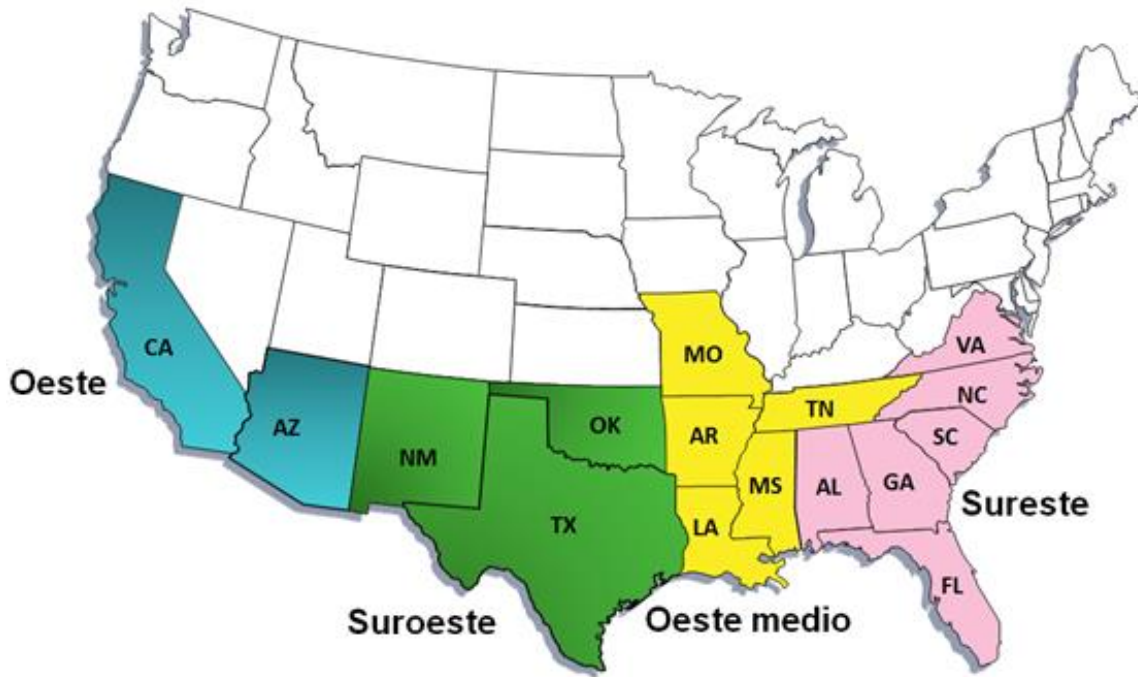
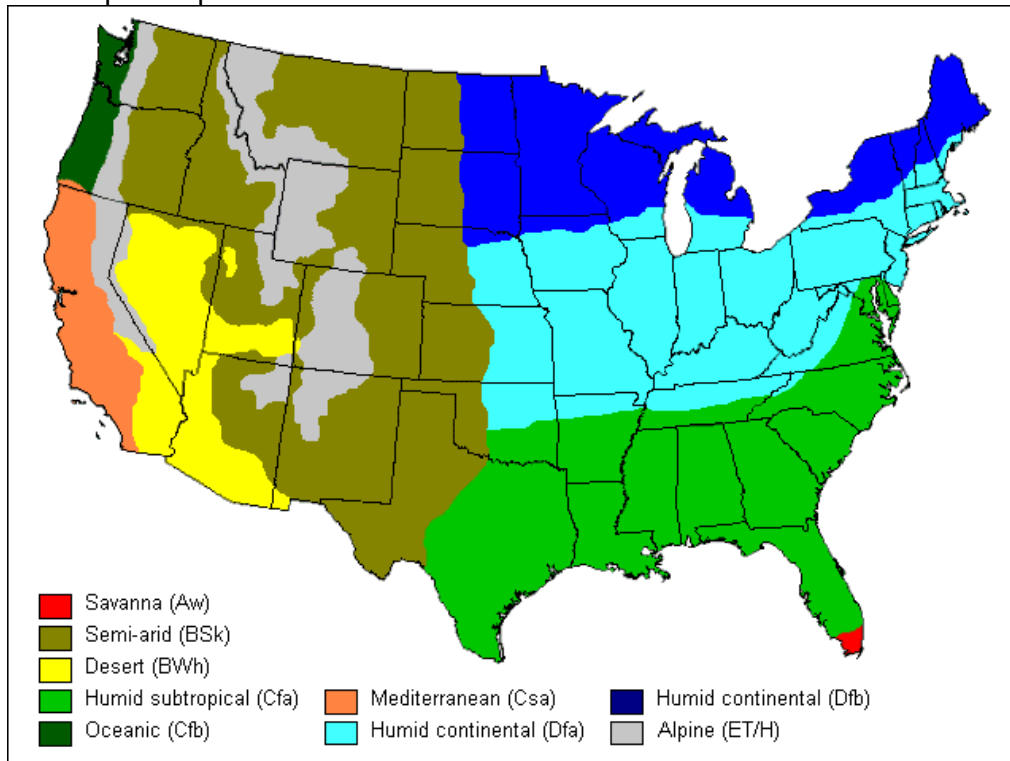


Figura 86. Principales tipos climáticos de Estados Unidos.





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

1. Tecnología GlyTol® (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 gopipol 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)⁸², 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 LibertyLink® (LLCotton25).

Las plantas de algodón que expresan el evento LLCotton25, producen por acción del gen bar la proteína fosfinotricina-N-acetil transferasa (PAT) (Thompson et al., 1987) que 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. Por su uso tan extendido en cultivos biotecnológicos, tanto como marcador de selección como evento de tolerancia herbicidas, la seguridad de la proteína PAT ha sido ampliamente evaluada. Los datos presentados muestran que la proteína PAT expresada en las plantas GM tiene un impacto insignificante sobre el fenotipo de dichas plantas, más allá de conferirles tolerancia al herbicida glufosinato.

Un análisis de la composición de algodón que expresa la proteína PAT evaluó nutrientes importantes y básicos de algodón (proximales), así como micro-nutrientes (minerales y vitamina E), los anti nutrientes (gossipol libre y total), los aminoácidos totales, los ácidos grasos totales (ácidos grasos ciclopropenoides) y ácido fítico. Se midió en las semillas y los productos de borra de algodón, cascós, harina, harina tostada, aceite crudo y refinado. Al realizar análisis de la composición semillas LLCotton25 con sus contrapartes convencionales demsotro que no hay un solo compuesto, que se detecte que supera o no llega a la gama de bio-equivalencia de

⁸² Rouquie, D. 2006. 2mEPSPS protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex, France. M-276952-01-1



20% en las tres comparaciones dentro de las muestras analizadas. La diferencia absoluta entre los valores para el LLCotton25 y las muestras no transgénicas es tan pequeña que no tiene importancia nutricional así como los compuestos analizados están en el rango de nutrientes determinados para las variedades de algodón comerciales actualmente en el mercado⁸³.

Debido a que la proteína PAT está contenida dentro de la planta, el potencial para la exposición a la proteína se limita a la alimentación directa del algodón LLCotton25. 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 Garcin, J.C. (2010)⁸⁴, y la proteína PAT no se considera que sea tóxico para mamíferos, aves o insectos. Además, la exposición a polen de algodón que contiene la proteína PAT no es una preocupación para los organismos no blanco, debido a la baja expresión de la proteína en el polen de algodón.

Las evaluaciones de riesgo uso en el ambiente indican que la expresión de PAT no modifica el potencial de persistencia ni la propagación de plantas que expresan dicha proteína en el ambiente, no modifica la biología reproductiva ni el potencial de flujo de genes y no aumenta el riesgo de provocar efectos adversos en otros organismos. Si bien la introducción de la proteína PAT puede complicar el control de las voluntarias que toleran los herbicidas o las familiares que son maleza agrícola, no hay evidencia que indique que la expresión de PAT haya tenido un impacto sobre la efectividad o la disponibilidad de medidas de control alternativas, como son otros herbicidas o el control mecánico de malezas⁸⁵.

En la práctica, las plantas tolerantes a glufosinato de amonio que contienen estas proteínas PAT se han cultivado ampliamente en los EE.UU. y Canadá desde hace casi una década sin ningún registro de efectos adversos para la alimentación humana o animal. Además, numerosas agencias reguladoras la han aprobado para consumo humano y animal en muchos países como Australia, Argentina, México, Japón, Sudáfrica y la Unión Europea. En el contexto de una armonización de la descripción de la normativa en materia de biotecnología, OCDE publicó un documento de consenso sobre la información general relativa al gen *bar* y de su respectiva proteína (OCDE, 1999). Toda la información recopilada en este informe converge hacia las características inocuas de las enzimas PAT. Sobre la base de este tipo de información, la EPA establece una exención del requisito de una tolerancia en todos los productos agrícolas crudos (EPA, 1997)

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

⁸³ Oberdörfer, R. 2006. Amendment to the Nutritional Impact Assessment Report on LibertyLink® Cotton Transformation Event LLCotton25. Bayer CropScience GmbH. Germany. M-217437-03-1

⁸⁴ Garcin, J.C. 2010. LLCotton25 90-Day toxicity study in the rat by dietary administration of toasted meal. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex, France. M-384718-01-1

⁸⁵ ILSI. 2013. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína PAT. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C.



Para otorgar la des-regulación de los eventos GHB614 y LLCotton25, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) evaluó los efectos de las proteínas expresadas por dichos eventos (2mEPSPS y PAT/*bar*), 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 des-regulación para los eventos GHB614 y LLCotton25.

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.

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-Guichenev *et al.*, 2009).

Rouquie (2006b)⁸⁶ evaluó el potencial de similitud de la secuencia aminoácidos de la proteína doble mutante del maíz 5-enol pyruvylshikimate-3-fosfato sintasa (2mEPSPS) con toxinas o alérgenos conocidos. La comparación de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS se llevó a cabo mediante un estudio en general de homologías 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 GHB614 y el algodón LLCotton25, 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® LibertyLink®, es igual que sus progenitores y por consiguiente seguro.

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

La combinación de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (LLCotton25) 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, Uno de los mayores beneficios ha sido la adopción de sistemas de labranza reducida, es decir, menos pasos de labranza. Esta reducción hace que el suelo esté más protegido, se erosione menos y conserve la humedad y la materia orgánica se descomponga y se integre al suelo. El porcentaje de incremento de este sistema ha sido más alto en algodón que en ningún otro cultivo debido a la adopción tan alta de tecnologías de tolerancia a herbicidas, incrementos en el precio del diesel, mejores herbicidas que controlan el mayor espectro de malezas con mayor efectividad. Sin embargo, la principal razón de este incremento en prácticas de labranza reducida ha sido la disponibilidad de las tecnologías de tolerancia a herbicidas (Sankula, 2006).

Los cambios que la biotecnología agrícola ha inducido por el volumen y toxicidad de los herbicidas no son todavía bien conocidos, sin embargo, un estudio muy reciente concluye que los cultivos tolerantes a herbicidas tienen el potencial de reducir la contaminación y mitigar el

⁸⁶ 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.



impacto ambiental de otros pesticidas en la producción agrícola (Hoyle, 1993; Conko, 2003; Margriet, 1998 y Brookes y Barfoot, 2005).

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

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

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

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

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

- Existe un incremento en la flexibilidad de manejo que viene de la combinación de la facilidad de uso de los herbicidas asociada con la ventana de aplicación postemergente de herbicidas de amplio espectro.
- Comparado con cultivos convencionales, donde la aplicación postemergente resulta muy complicada y riesgosa, en los cultivos tolerantes GM, esto no representa un problema.
- En general, el hacer más eficiente el manejo de maleza resulta en menores costos de producción.
- Debido a la naturaleza de los herbicidas usados con los cultivos GM, se reduce la aplicación de herbicidas muy residuales que pueden afectar el establecimiento de cultivos en ciclos subsecuentes.



Datos duros muestran que ha existido una reducción neta del 15.3% en el impacto ambiental de las áreas de cultivo debidas al uso de cultivos GM desde 1996. El volumen total de ingrediente activo aplicado a los cultivos se ha reducido en 7%, en el [cuadro 45](#) se resume de manera concisa los beneficios ambientales obtenidos por el uso de los cultivos GM en el mundo. El caso del algodón resulta evidente la baja adopción de la tecnología (HT cotton) en los países en desarrollo, evitando tener los beneficios ambientales a los que ya acceden los países desarrollados (99% de reducción en el impacto ambiental).

Cuadro 45. Beneficios ambientales de los cultivos GM derivado del uso bajo de insecticidas y herbicidas en 2005: países en vías de desarrollo versus países desarrollados.

	<i>%total de reducción de impacto ambiental: países desarrollados</i>	<i>%total de reducción de impacto ambiental: países en desarrollo</i>
GM HT Soya	53	47
GM IR Maíz	92	8
GM HT Maíz	99	1
GM IR Algodón	15	85
GM HT Algodón	99	1
GM TH Canola	100	0
Total	46	54

Países en desarrollo incluye todas los países en Suramérica

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

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

La tecnología LibertyLink® (evento LL25) ha sido evaluada sin observarse algún efecto adverso al ambiente, ni alteración o daño en la diversidad biológica; así como ningún efecto dañino a la sanidad animal, vegetal y acuícola. Esto se ha observado consistentemente en todas las regiones del mundo donde se ha sembrado y se siembra el algodón LL25® (ej. Estados Unidos, Australia).

Los beneficios de las tecnologías de tolerancia a herbicidas que se han observado ha sido la facilidad y seguridad del cultivo para los agricultores del sistema comparado con otros controles como el manual, mecánico y herbicidas selectivos o residuales, además de que los costos de producción también han decrecido ya que los agricultores tienen que hacer menos pasos de maquinaria en el cultivo, menos limpiezas manuales, y aplicación de otros herbicidas con menor espectro de control y eficacia (Sankula, 2006⁸⁷), otra ventaja es que el cultivo del algodón no se daña, mientras que el convencional puede dañarse con una mala aplicación de herbicidas selectivos o residuales, pasos de maquinaria y limpieza manual con azadón que llegan a dañar las raíces del cultivo.

⁸⁷ Sankula S. 2006. Quantification of the impacts on US agriculture of biotechnology-derived crops planted in 2005. National Center for Food and Agricultural Policy. Washington, DC 20036. www.ncfap.org



Otra de las ventajas que presenta el utilizar variedades de algodón tolerantes a herbicidas es que se pueden necesitar menos aplicaciones de herbicidas que con el algodón convencional porque los herbicidas que se utilizan son de amplio espectro y pueden aplicarse a cualquier altura o etapa de desarrollo del cultivo, de tal forma que la aplicación está en función del problema, la maleza, por lo que son más efectivos.

Tanto glifosato como glufosinato son herbicidas post-emergentes, no residuales, no selectivos, de aplicación total al cultivo que tienen las respectivas tecnologías. Sin embargo, hay grandes contrastes entre los dos sistemas de control de malezas. El herbicida glufosinato de amonio presenta un espectro de control diferente al glifosato; es decir, su efectividad es menor contra algunas especies de hoja angosta como el zacate Johnson (*Sorghum halepense*, Fam. Poaceae), el Coquillo (*Cyperus esculentus*, *Cyperus rotundus*, Fam. Cyperaceae) y bajo ciertas circunstancias contra el Quelite (*Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus hybridus*, Fam. Amaranthaceae). Por otro lado, Glufosinato de amonio presenta un amplio espectro de control contra especies de hoja ancha que Glifosato, por ejemplo contra malezas como Correhuela (*Convolvulus arvensis*, Fam. Convolvulaceae), Malva (*Malva parviflora*, Fam. Malvaceae), Cadillo (*Xanthium strumarium*, Fam. Asteraceae) y Amargosa (*Parthenium hysterophorus*, Fam. Asteraceae) entre otras.

La combinación de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/bar (LLCotton25) esta combinación de mecanismos de acción es particularmente importante para el manejo y prevención de resistencia de las especies de maleza a los herbicidas.

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

El país de origen del algodón GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25) 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 GL por ser un producto de cruzamiento convencional de dos eventos independientes, no necesita una aprobación como evento apilado en el país de origen.

Cuadro 46. 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	



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

País	Consumo humano	Consumo animal	Cultivo
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 47. Resumen de aprobaciones internacionales para consumo, procesamiento y cultivo del algodón LLCotton25 (OECD: ACS-GHØØ1-3).

País	Consumo humano	Consumo animal	Cultivo
Australia	2006		
Brazil	2008	2008	2008
Canada	2004	2004	
China	2006	2006	
Colombia		2008	
Costa Rica		2009	
European Union	2008	2008	
Japan	2004	2006	2006
Mexico	2006		
New Zealand	2006		
South Africa	2011	2011	
South Korea	2005	2005	
Taiwan	2015		
United States of America	2003	2003	2003

Fuente: www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/; www.accessdata.fda.gov/; www.aphis.usda.gov/biotechnology/

Cuadro 48. Resumen de aprobaciones internacionales para consumo, procesamiento y cultivo del algodón GHB614 x LLCotton25 (OECD: BCS-GHØØ2-5 x ACS-GHØØ1-3).

País	Consumo humano	Consumo animal	Cultivo
Argentina	2015	2015	2015
Brazil	2012	2012	2012
Colombia			2013
European Union	2015	2015	
Japan	2010	2010	2010
Mexico	2010		
South Korea	2012	2011	
Taiwan	2015		

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

a) 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).



b). 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).

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. Algodón tolerante a glufosinato de amonio.

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 amoniaco en glutamina. La inhibición de la glutamina sintetasa provoca una acumulación de amoniaco 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® LibertyLink® (GL) brinda tolerancia a la aplicación de los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, en las variedades de algodón de Bayer CropScience.

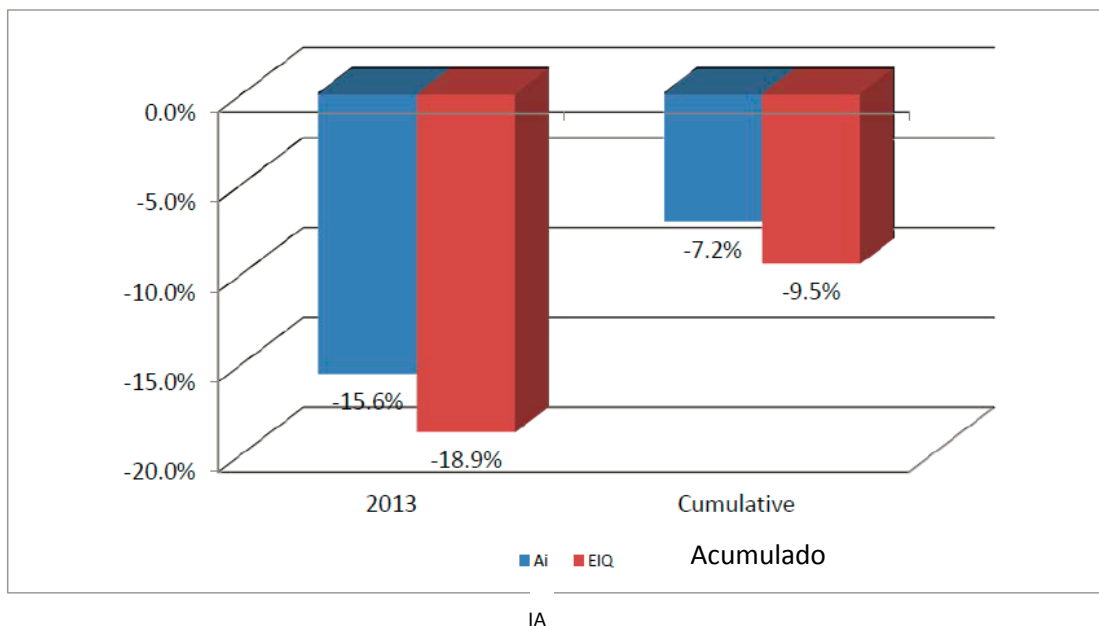
Con relación al manejo de maleza en algodón, las variedades GlyTol® LibertyLink® son tolerantes a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato mediante la expresión de las proteínas PAT de *Streptomyces hygroscopicus* y 2mEPSPS del maíz, permitiendo el uso de dos mecanismos de acción herbicida para 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 87).
- Disminución de la contaminación del suelo y mantos freáticos al utilizar herbicidas con menor impacto ambiental (Cuadro 49).
- 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 50 - 52).
- 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).

Figura 87. 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 49. 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



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

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 50. 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, 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



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

Nombre científico	Familia botánica	Clasificación morfológica
<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 51. 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, A. hybridus, 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



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

Nombre científico	Familia botánica	Clasificación morfológica
<i>Acalypha alopecuroides</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 52. 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.

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).

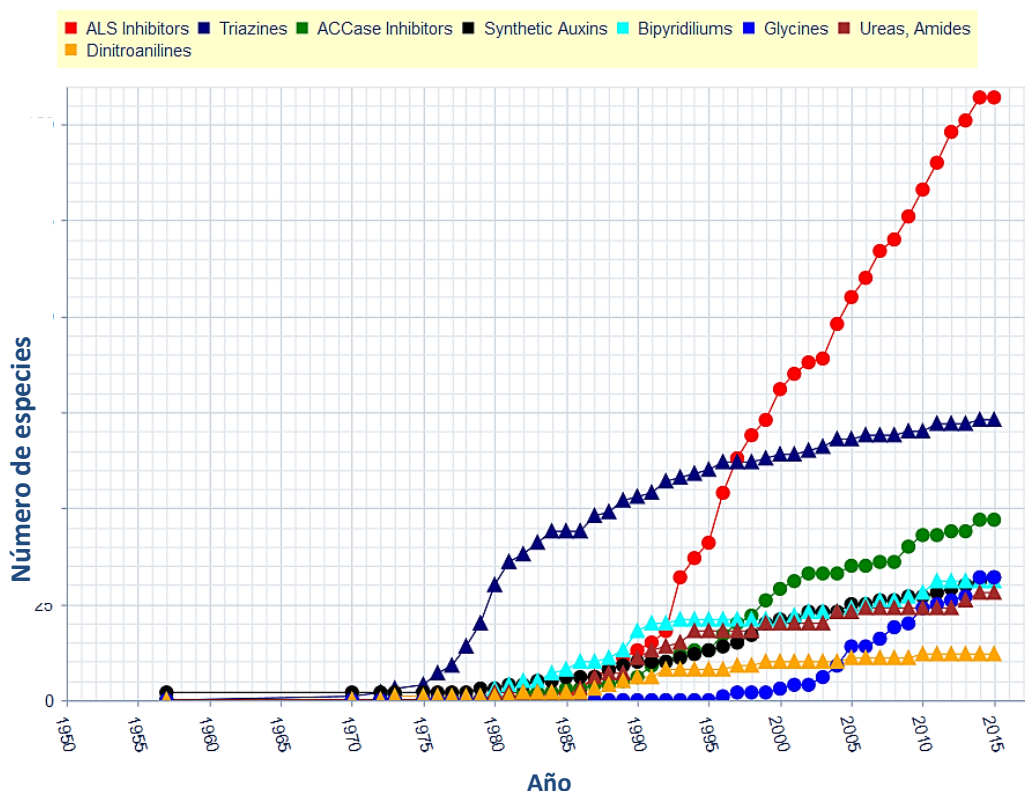
La resistencia a los herbicidas no es un problema que se presente en forma súbita en un terreno en particular, ni es la falta de control de malezas en un solo año. Puede ocurrir primero en una pequeña área o áreas, especialmente en donde se han utilizado herbicidas con el mismo modo de acción por varios 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 88](#) 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 88. Incremento cronológico en el número de malezas resistentes a herbicidas pertenecientes a distintos grupos (Heap, 2015).



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 algodónero, y son necesarios de dos a tres deshierbes, realizando cada uno después de los dos o tres primeros riegos de auxilio, suficientes para mantener el terreno libre de malezas durante el período crítico. Sin embargo, al presentarse especies perennes su eficiencia es limitada (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 algodónero permanece. 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 fluazifop 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 & 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 53](#) se presentan los herbicidas recomendados para el control de maleza en el cultivo de algodón en México (PLM, 2014).

Cuadro 53. 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	Arilofenoxi propionato	POST dirigido a la maleza	Hoja angosta



Solicitud de permiso para la liberación al ambiente de algodón GlyTol® LibertyLink® en etapa experimental en la región agrícola del Norte de Tamaulipas, ciclo P-V 2017.

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
Piritiobac sodio	SP 85% (850 g/kg)	85 - 97.75 g/ha	Pirimidincarboxy	POST	Hoja ancha
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 GlyTol® LibertyLink® (Cuadro 54).

Cuadro 54. 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



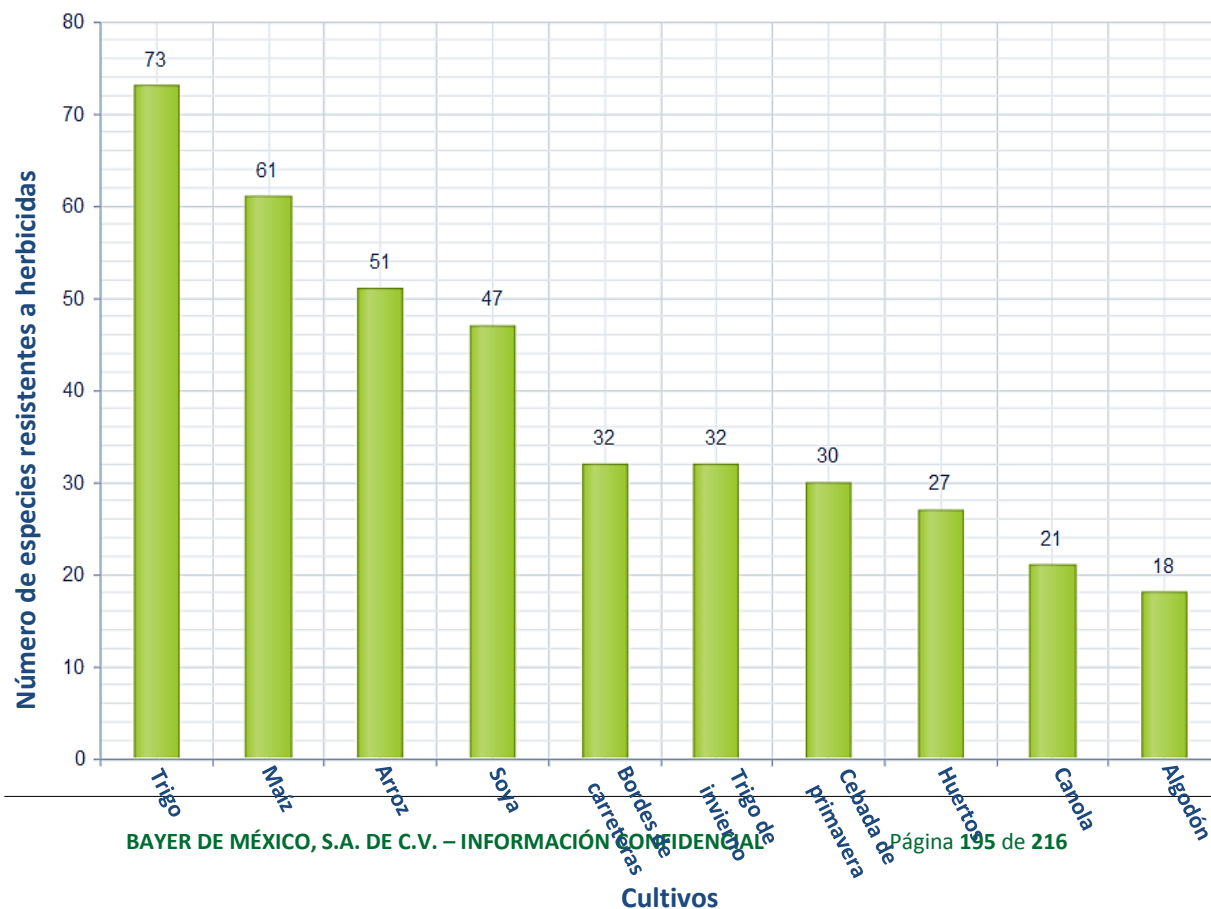
Alaclor	Cloroacetamida	17.86
Clethodim	Ciclohexanediona	17
Prometrina	Triazina	15.37
Glifosato	Glicinas	15.33
Fluometuron	Fenilurea	14.27

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

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 89](#) puede observarse el número de especies resistentes a diferentes herbicidas de acuerdo al tipo de cultivo en los que se han utilizado.

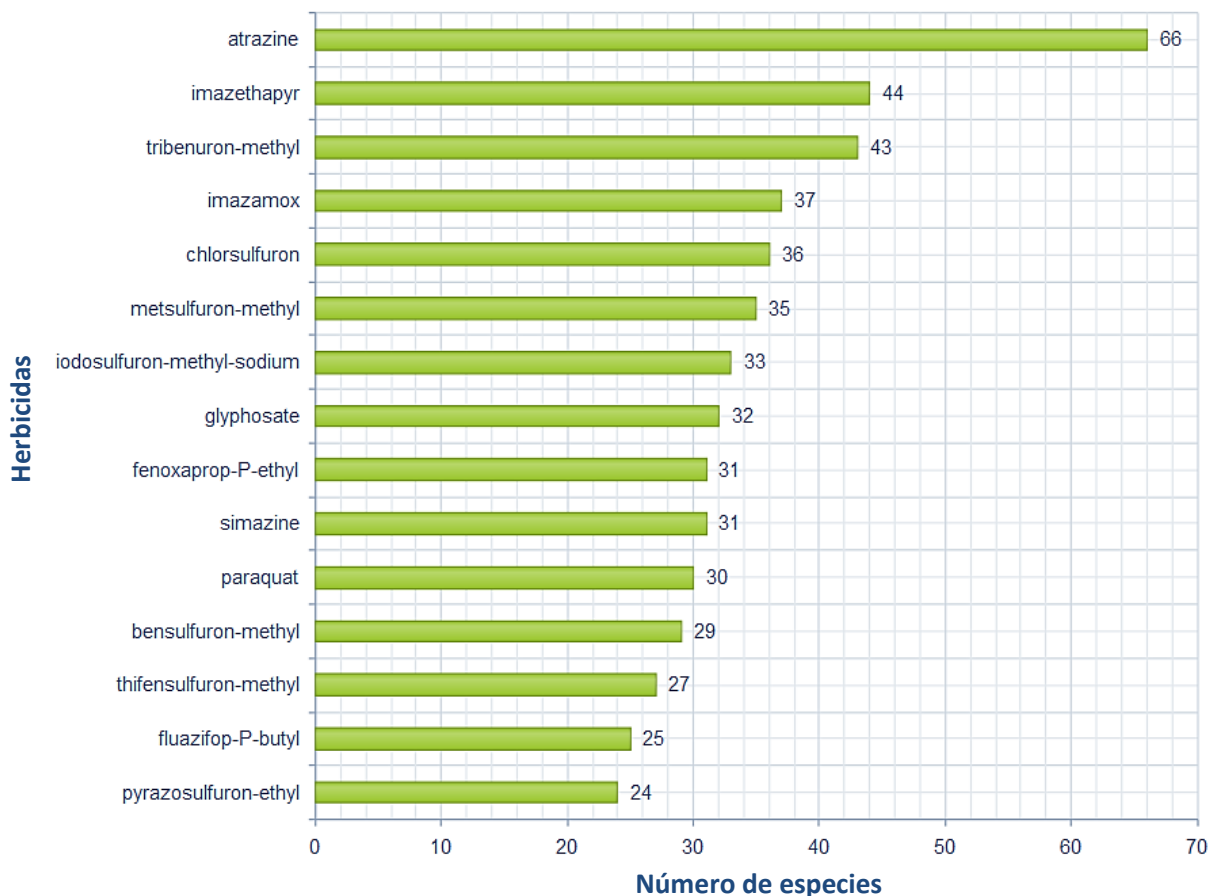
Figura 89. Número de especies resistentes a herbicidas por cultivo (Heap, 2015).





En la [figura 90](#) 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 90. 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 55](#)).



Cuadro 55. 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/>

c). 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).

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 91. Gusano bellotero (*Helicoverpa zea*).



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 92. Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*).



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 cuadro, 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 93. Gusano soldado (*Spodoptera exigua*).



4. Gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*).

El gusano rosado, al igual que otras plagas ha disminuido su importancia como plaga principal del algodonoero, 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 94. Gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*).



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 95. Mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*).



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 96. Picudo del algodnero (*Anthonomus grandis*).



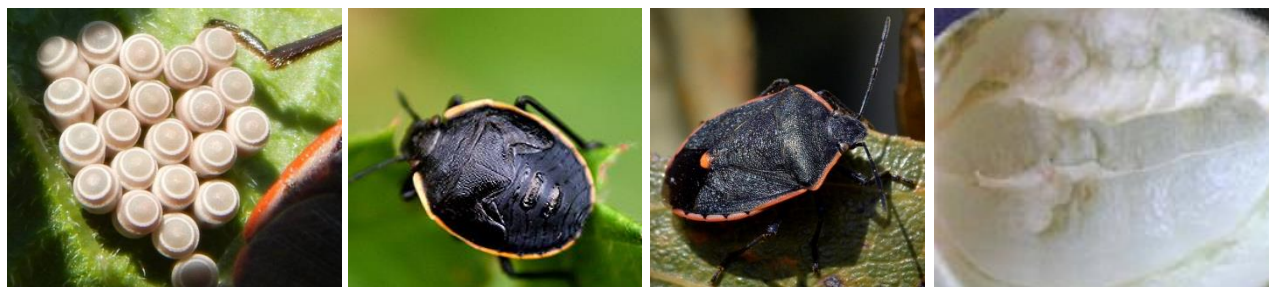
7. Conchuela del algodón (*Chlorochroa ligata* Say).

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 97. Conchuela del algodón (*Chlorochroa ligata* Say).



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 cuadritos 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 98. Chinche Lygus (*Lygus* spp.).



9. Thrips.

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 algodónero. La principal forma de dispersión es el viento; la dirección y velocidad del viento tiene mucha influencia en las infestaciones en algodónero.

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 99. Daño por trips en el cultivo de algodón.



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 100. Pulgón del algodón (*Aphis gossypii*).



d) Control químico de insectos

El control de plagas en el cultivo de algodón se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro (Cuadro 55), 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 56. 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 metílico	WP 35% (350 g/kg)	315 - 490	Altamente tóxico	Organofosforado
Betaciflutryn	SC 11.8% (125 g/L)	18.75 - 25	Ligeramente tóxico	Piretroide
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 algodónero 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.

g) Literatura consultada.

- Askew, S., & Wilcut, J.W. (2002). Ladythumb interference and seed production in cotton. *Weed Sci.* 50
- Brookes, G and Barfoot, P. 2005. PG Economics Ltd., Dorchester, UK, GM Crops: The Global Economic and Environmental Impact—The First Nine Years 1996–2004, *AgBioForum*, 8(2&3): 187-196.
- Brooks, G. and Barfoot, P. 2006. GM Crops: The First ten years-Global Socio-Economic and Environmental Impacts. ISAAA Brief No. 36. ISAAA: Ithaca, NY. 196 p.
- Conko, G. 2003. Competitive Enterprise Institute Director, LOS BENEFICIOS DE LA BIOTECNOLOGÍA, revista *Regulation*, 1:2003
- 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.
- 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).
- 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).



- Garcin, J.C. 2010. LLCotton25 90-Day toxicity study in the rat by dietary administration of toasted meal. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex, France. M-384718-01-1
- 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.
- Heap, I. 2015. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://weedsscience.org/?asperrorpath=/summary/%20home.aspx/>
- Hernández-Vázquez, B.; Alvarado-Padilla, J.I.; Ávila-Casillas, E.; Payan-Ochoa, S.; Morales-Maza, A.; Loza-Venegas, E. 2010. Guía técnica para el área de influencia del Campo Experimental Valle de Mexicali. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Valle de Mexicali. Mexicali, Baja California, México.
- Herouet-Guicheney, C.; Rouquié, D.; Freyssinet, M.; Currier, T.; Martone, A.; Zhou, J.; Bates, E.; Ferullo, J.; Hendrickx, K.; Rouan, D. 2009. Safety evaluation of the double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54:143–153.
- Hérouet, C.; Esdaile, D.J.; Mallyon, B.A.; Debryne, E.; Schulz, A.; Currier, T.; Hendrickx, K.; van der Klis, R.; Rouan, D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134–149.
- 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.; Loza-Venegas, E. 2010. Guía para producir algodón en el Valle de Mexicali, B. C. y San Luis Río Colorado, Son. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De InvestigalCIÓN Regional Del Noroeste. Campo Experimental Valle De Mexicali. Mexicali, B.C.
- Hoyle, Russ (1993). “Herbicide-Resistant Crops are No Conspiracy.” *Bio/Technology*. Vol. 11. July, pp. 783-784.
- ILSI. 2013. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína PAT. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C.
- 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.
- 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.
- 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 algodón para escape al daño de mosquita blanca de la hoja plateada*. Mexicali, B.C.: Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California.
- McGregor, S. (1976). *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants*. Agriculture Handbook No. 496. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
- Malik J., Barry G., Kishore G. 1989. The herbicide glyphosate. *Biofactors* 2:17-25.
- Margriet F. Caswell, Keith O. Fuglie, Cassandra A. Klotz. 1998. An Economic Research Service Report Agricultural: Biotechnology An Economic Perspective, USDA ERS. pp. Sept: 35-36



- Niles, G., & Feaster, C. (1984). Breeding. En R. Kohel, & C. Lewis, Cotton Agronomy (Vol. 24, págs. 201-223). Madison, WI: American Society of Agronomy.
- 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.
- Oberdörfer, R. 2006. Amendment to the Nutritional Impact Assessment Report on LibertyLink® Cotton Transformation Event LLCotton25. Bayer CropScience GmbH. Germany. M-217437-03-1
- 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.
- 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., Medina, C.T. 2008. Manejo de maleza en cultivos básicos. Memoria XXIX Congreso de la ASOMECIMA A.C. Tapachula, Chiapas, México.
- Rosales, R. E. Y Sánchez de la C. R. 2005. Control post-emergente de maleza en variedades de algodónero tolerantes a glufosinato de amonio. Memorias del XXVI Congrso Nacional de la Ciencia de la Maleza. Cd Victoria, Tamaulipas, México. (En anexo en letra I).
- Rouquie, D. 2006. 2mEPSPS protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex, France. M-276952-01-1
- 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.
- Sankula S. 2006. Quantification of the impacts on US agriculture of biotechnology-derived crops planted in 2005. National Center for Food and Agricultural Policy. Washington, DC 20036. www.ncfap.org
- SAP (Sistemas, Aplicaciones y Productos) es un sistema de gestión de recursos empresariales que integrar muchas o todas las funciones de la empresa como finanzas, planificación, costos, comercial, mercadeo, manufactura, logística, mantenimiento, control de calidad y Recursos Humanos.
- Sundstrom, F. (2001). Pollen Transfer in Cottonseed Production. In The Biotech Evolution of the Seed Industry: Adventitious Presence, Quality Assurance and Orderly Marketing.
- 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.
- 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.
- 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).
- Van Deynze, A., Sundstrom, F., & Bradford, K. (2005). Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity. Crop Sci., 45, 1565–1570.
- Vargas, C. J. E., F. Villarreal, y E. Salgado. 1979. Líneas de algodónero resistentes al ataque del complejo bellotero *Heliothis* spp en el sur de Tamaulipas. Agríc. Tec. M ex. 5: 11-19.
- 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.



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

***En caso de no contar con dicha autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente, anexa a un escrito libre en el que se indiquen el Número de autorización y el número de folio.**

En México, el algodón GlyTol® LibertyLink® (GHB614 x LLCotton25), cuenta con la autorización **No. 093300CO041536 de fecha 20 de enero de 2010 (COF - 10989)**, expedida por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la cual determinó que el algodón GL es equivalente sustancialmente a su contraparte convencional y puede ser usado como pienso para alimentación en animales y subproductos para alimentación humana (**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**).

El algodón GlyTol® LibertyLink® combina la expresión de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y PAT/*bar* (LLCotton25) 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 LA VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA

Se solicita el permiso para el ciclo agrícola PV-2017. Este periodo incluye actividades previas a la siembra del algodón GL: GlyTol® LibertyLink® (BCS-GHØØ2-5 x ACS-GHØØ1-3) 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 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 (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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**. 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.
- 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 SAP⁸⁸.
- 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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**, 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**


⁸⁸ SAP (Sistemas, Aplicaciones y Productos) es un sistema de gestión de recursos empresariales que integrar muchas o todas las funciones de la empresa como finanzas, planificación, costos, comercial, mercadeo, manufactura, logística, mantenimiento, control de calidad y Recursos Humanos.



Preservation of Product Genetic Integrity and Traceability of Seeds and Traits (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL).

- 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.
- 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 101](#)).
- 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 101. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.



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: **XXXXXXXXXX** País de origen: **XXXXXXXXXX**
 Evento: **XXXXXXXXXX**
 Identificador OCDE: **XXXXXXXXXX** 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:
 libaccidentalgm.dgiaap@senasica.gob.mx"
 C.P. 04100, Tel. +52 (55) 50903000 Ext. 51533

Centro de Atención Telefónica.
 018002293772 LADA sin costo.



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 CONVENCIONAL

SEMILLA DE [Cultivo (Nombre científico)] VARIEDAD/ CÓDIGO:

Tecnología: **NA** País de origen: **XXXXXXXXXX**
 Evento: **NA**
 Identificador OCDE: **NA** 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"



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 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)**.

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 libaccidental@m.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 (DGI AAP) 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® LibertyLink® (GL) siguiendo el objetivo planteado de comparar la equivalencia fenotípica del algodón GL con su contraparte convencional, así como documentar los beneficios, el impacto ambiental y uso seguro de la tecnología del cultivo de algodón GlyTol® LibertyLink® en las region agrícola del Norte del Estado de Tamaulipas.

Se presenta en el **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**, el protocolo detallado que se propone para la liberación en etapa experimental dentro de la zona agrícola del Norte del Estado de Tamaulipas, durante el ciclo agrícola PV-2017.



C. Beneficio económico y ambiental de los cultivos biotecnológicos.

1. Adopción de cultivos biotecnológicos.

Durante 2015 la adopción de cultivos biotecnológicos en el mundo alcanzó una superficie total de 179.7 millones de hectáreas distribuidas en 28 países, sobresaliendo por la superficie sembrada Estados Unidos, Brasil, Argentina, India y Canadá (Cuadro 57). Los cultivos biotecnológicos más importantes son soya, maíz, algodón y canola, los cuales alcanzaron una superficie sembrada de 178.4 millones de hectáreas, esto represento alrededor del 49.3% de la superficie global destinada a estos cultivos (Figura 102).

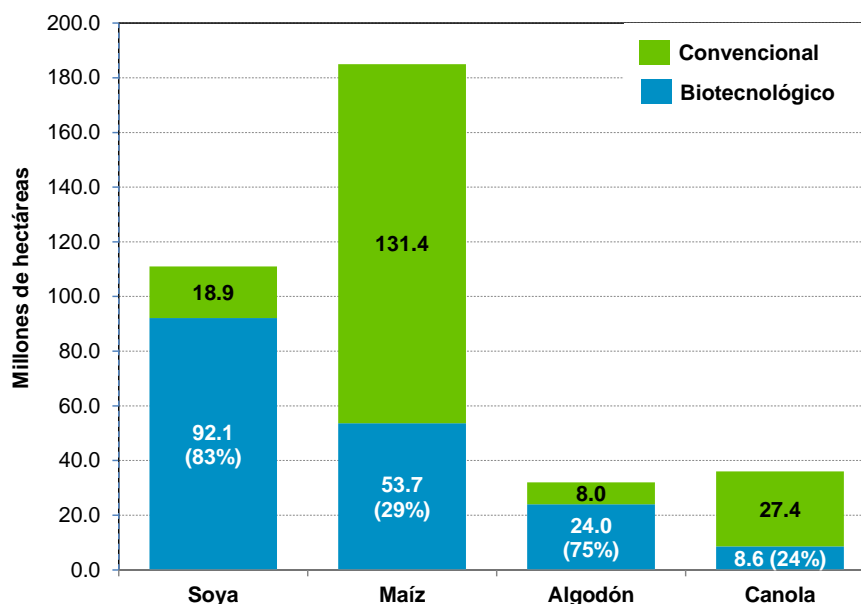
Cuadro 57. Superficie sembrada con cultivos biotecnológicos por país durante 2015.

País	Superficie sembrada (millones de hectáreas)	Cultivos
Estados Unidos	70.9	Maíz, soya, algodón, canola, remolacha azucarera, papaya, calabaza, papa
Brasil	44.2	Soya, maíz, algodón
Argentina	24.5	Soya, maíz, algodón
India	11.6	Algodón
Canadá	11.0	Canola, maíz, soya, remolacha azucarera
China	3.7	Algodón, papaya, álamo (<i>Populus</i>)
Paraguay	3.6	Soya, maíz, algodón
Pakistán	2.9	Algodón
Sudáfrica	2.3	Maíz, soya, algodón
Uruguay	1.4	Soya, maíz
Bolivia	1.1	Soya
Filipinas	0.7	Maíz
Australia	0.7	Algodón, canola
Burkina Faso	0.4	Algodón
Myanmar	0.3	Algodón
México	0.1	Algodón, soya
España	0.1	Maíz
Colombia	0.1	Algodón, maíz
Sudán	0.1	Algodón
Honduras	<0.1	Maíz
Chile	<0.1	Maíz, soya, canola
Portugal	<0.1	Maíz
Vietnam	<0.1	Maíz
República Checa	<0.1	Maíz
Eslovaquia	<0.1	Maíz
Costa Rica	<0.1	Algodón, soya
Bangladesh	<0.1	Berenjena
Rumanía	<0.1	Maíz
Total:	179.7	

Fuente: James, C. 2015. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.



Figura 102. Adopción global de los principales cultivos biotecnológicos durante 2015.



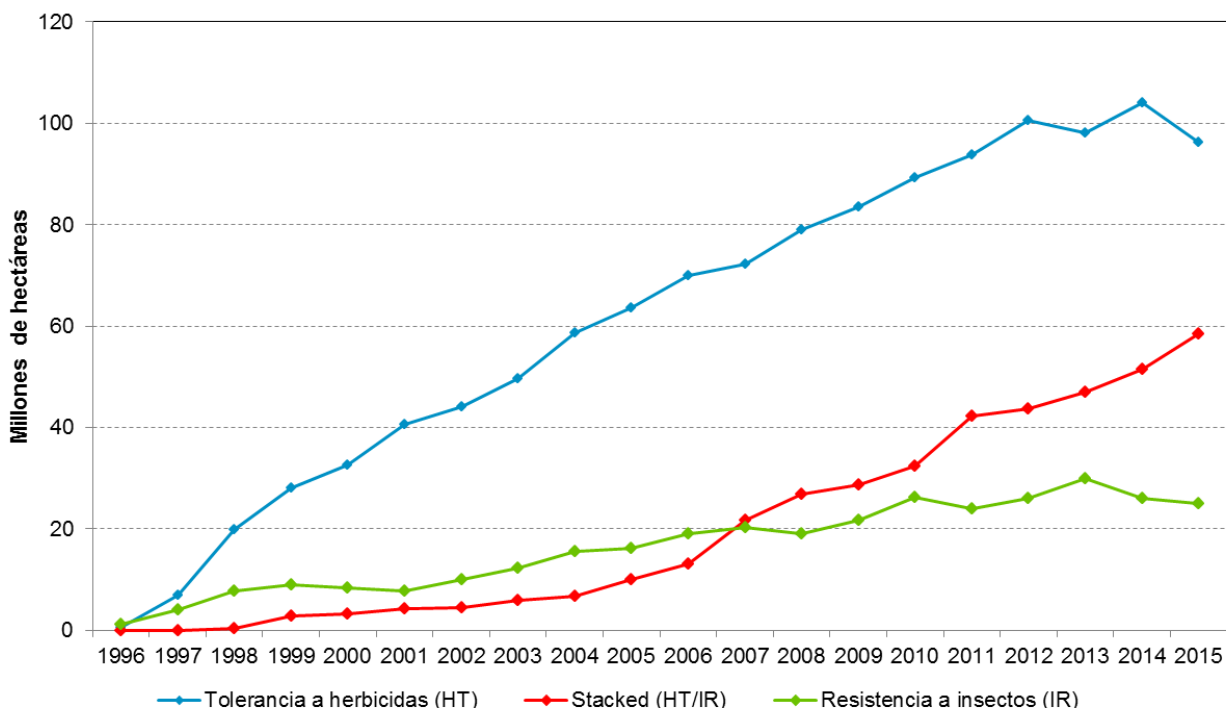
Fuente: James, C. 2015. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

La tolerancia a herbicidas ha sido consistentemente la característica biotecnológica dominante a nivel global y los cultivos con tolerancia a herbicidas se sembraron en alrededor de 96.2 millones de hectáreas, asimismo, se ha observado un crecimiento consistente en la superficie sembrada con cultivos que combinan las características de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos (*stack*) alcanzado una superficie de 58.5 millones de hectáreas. En tercer lugar se encuentra la característica de resistencia a insectos con una superficie sembrada de alrededor de 25 millones de hectáreas durante 2015 (Figura 103).

La experiencia acumulada durante 20 años de comercialización de cultivos biotecnológicos a nivel global, ha permitido confirmar el beneficio económico para los agricultores, el cual fue estimado en \$150 mil millones de dólares acumulados durante el periodo 1996 a 2015. Los cultivos biotecnológicos han generado importantes beneficios agronómicos, ambientales, económicos para los agricultores y para las sociedades de las regiones donde éstos se cultivan. La rápida adopción de cultivos biotecnológicos por parte de pequeños y grandes agricultores en países desarrollados y en vías de desarrollo, es el resultado de los beneficios que esta tecnología aporta a la sociedad.



Figura 103. Adopción global de cultivos biotecnológicos por característica 1996 - 2015.



Fuente: James, C. 2015. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

En México también se cuenta con una experiencia acumulada durante los últimos 20 años de siembra de algodón biotecnológico a nivel experimental, piloto y comercial, con las características de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos lepidópteros. Durante este periodo se ha realizado una gran cantidad de evaluaciones a través de instituciones de investigación agrícola como el INIFAP y diferentes Universidades, sobre la caracterización agronómica, manejo de plagas y maleza, efecto en insectos no blanco y monitoreo de susceptibilidad de insectos lepidópteros a proteínas Cry. Los resultados de estas evaluaciones, así como la experiencia del manejo del cultivo en campo, permiten concluir que el algodón biotecnológico no presentan ninguna diferencia en el manejo agronómico, morfología, desarrollo fenológico y efecto en insectos no blanco respecto del algodón convencional, excepto por su tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio y resistencia a las plagas objetivo de las tecnologías: gusano tabacalero (*Heliothis virescens* Fabricius), gusano bellotero (*Helicoverpa zea* Boddie) y gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders).

2. Beneficio económico y ambiental.

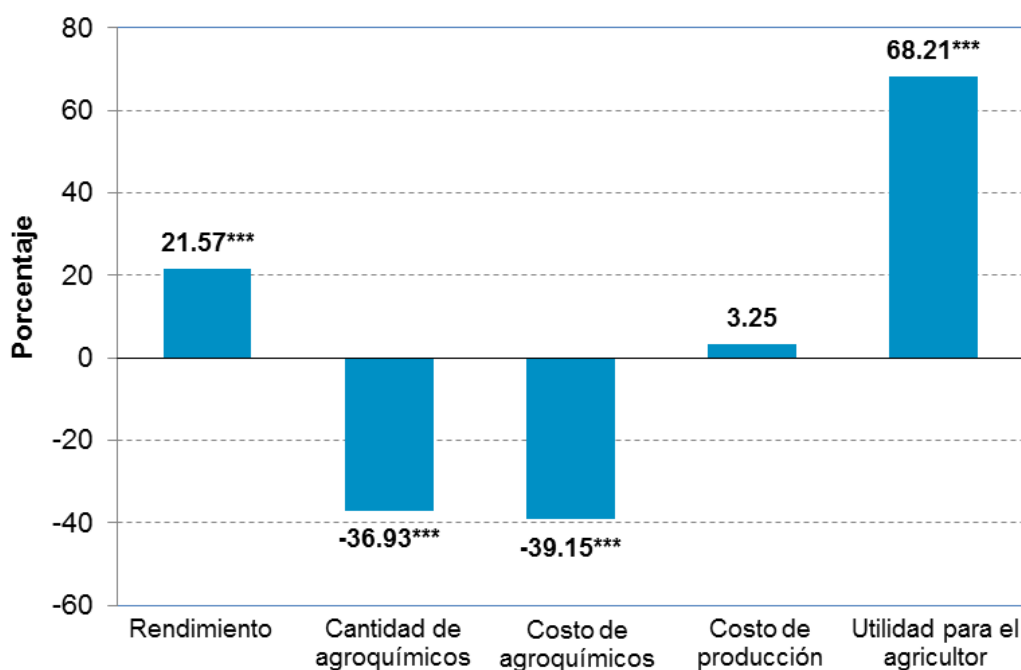
Qaim & Klümper (2014) realizaron un meta-análisis mediante el análisis de estudios identificados a través de búsqueda en ISI Web of Knowledge, Google Scholar, EconLit y AgEcon Search. Los estudios fueron elegidos con base en los criterios de contener una fuente original de datos obtenidos de encuestas con agricultores o de ensayos de campo y cuando se reportaban impactos de la siembra de soja, maíz o algodón biotecnológicos en el rendimiento de los cultivos, uso de agroquímicos y/o utilidades económicas para los agricultores. En total



se incluyeron 147 estudios y se analizaron los factores que influyen en los beneficios observados en los cultivos biotecnológicos mediante la técnica estadística de meta-regresión, así como la determinación de las diferencias promedio entre cultivo GM y no-GM, diferencias absolutas o en porcentaje, o coeficientes estimados de modelos de regresión para calcular el porcentaje de diferencia entre un cultivo GM y no-GM.

Los resultados del estudio de Qaim & Klümper (2014) contribuyen de manera importante a consolidar la evidencia en relación con los beneficios económicos derivados de la adopción de cultivos GM. El incremento en rendimiento promedio ha sido de 21.5% debido a un control más eficiente de insectos plaga y reducción de daño en los cultivos GM, asimismo, se ha reducido la liberación de plaguicidas al ambiente en un 36.9% y su costo en un 39.1%. El efecto en el costo total de producción no es significativo, sin embargo, el costo de las semillas GM se compensa a través del ahorro en costo de compra de plaguicidas y su aplicación. La utilidad promedio para lo agricultores ha sido 68.2% mayor que en los cultivos convencionales (Figura 104).

Figura 104. Impacto de la adopción de cultivos biotecnológicos 1996 - 2014.



Porcentaje de diferencia entre cultivos GM y no-GM. Los resultados se refieren a todos los cultivos GM analizados, incluyendo las características de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos. El número de observaciones varía con base en la variable analizada; rendimiento: 451; cantidad de agroquímicos: 121; costo de agroquímicos: 193; costo de producción: 115; utilidad para el agricultor: 136. *** indica significativo estadísticamente a 1%.

Fuente: Klümper, W.; Qaim, M. 2014. A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. PLoS ONE 9 (11): e111629. doi:10.1371/journal.pone.0111629, NY.

La siembra de cultivos biotecnológicos también ha contribuido significativamente a reducir la emisión de gases de efecto invernadero por las actividades agrícolas. La disminución en las aplicaciones de insecticidas y herbicidas ha permitido una reducción en el uso de combustibles necesarios para su fabricación, transporte y aplicación, al tiempo que la adopción de cultivos



tolerantes a herbicidas facilitan la adopción de sistemas como la labranza de conservación, contribuyendo a su vez con el ahorro de energía necesaria para el laboreo del suelo (Brookes and Barfoot, 2005). Brookes y Barfoot (2005) estimaron una reducción global en la emisión de dióxido de carbono de 61 millones de kilogramos por la siembra de algodón biotecnológico resistente a insectos.

En el caso de México, Traxler y Godoy-Avila (2004) analizaron los aspectos económicos y ambientales del algodón biotecnológico en la región de la Comarca Lagunera. Los resultados del estudio indican que el algodón biotecnológico es una importante herramienta para la producción de algodón contribuyendo a la reducción en el uso de insecticidas al menos en un 50% con relación al algodón convencional y generando importantes beneficios económicos para los agricultores. En este estudio los investigadores determinaron que aproximadamente el 85% de los beneficios generados por la utilización de la tecnología fueron para los agricultores.

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

Los resultados reportados en el estudio de Traxler y Godoy-Avila (2004) son consistentes con los obtenidos en otras regiones algodonerías del mundo. En Argentina, Qaim y de Janvry (2003) reportan una reducción en las aplicaciones de insecticidas de 50% con relación al algodón convencional, principalmente de insecticidas altamente tóxicos, con el beneficio correspondiente para el ambiente y la salud de los agricultores. Adicionalmente los agricultores que adoptaron la tecnología de algodón resistente a insectos obtuvieron un rendimiento significativamente superior al obtenido en algodón convencional. La estimación econométrica realizada demuestra que se necesitarían duplicar las aplicaciones de insecticidas en algodón convencional para poder alcanzar los niveles de rendimiento por hectárea obtenidos en el algodón biotecnológico.