



SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN EXPERIMENTAL AL AMBIENTE DE ALGODÓN GLYTOL® TWINLINK® PLUS - GLTP (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102; OECD: BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7, EN LAS REGIONES AGRÍCOLAS DE CHIHUAHUA - COMARCA LAGUNERA, CICLO PV-2020.

Compañía:

BASF Mexicana S.A. de C.V.

Ciudad de México, a 26 de agosto de 2020

Este documento y sus anexos contienen información confidencial de BASF Mexicana S.A. de C.V. ("BASF"), y están destinados para uso exclusivo de la autoridad a la que se someten, asimismo solo pueden ser usados para respaldar las acciones solicitadas por BASF. BASF no otorga derecho o licencia de naturaleza alguna, sobre la información contenida en dichos documentos.

Según lo establecido en el Artículo 82 de la Ley de la Propiedad Industrial, los derechos de propiedad intelectual contenidos en el presente, son considerados secretos industriales cuyo titular exclusivo es BASF, por lo que de conformidad con el artículo 113 fracciones II y III y 117 de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública, deberán considerarse como información confidencial.



CONTENIDO

| | |
|--|------------|
| CONTENIDO | 2 |
| LISTA DE CUADROS | 4 |
| LISTA DE FIGURAS | 6 |
| Artículo 5. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. | 8 |
| 1. Nombre, denominación o razón social de quien promueve | 8 |
| Artículo 16. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados | 8 |
| I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM. | 8 |
| a) Identificador único del evento de transformación. | 8 |
| b) Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México..... | 8 |
| c) Especificación de la existencia de especies sexualmente compatibles. | 13 |
| d) Descripción de los hábitats donde el OGM puede persistir o proliferar..... | 14 |
| e) Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética. | 15 |
| f) País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido. | 24 |
| g) Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor..... | 24 |
| h) Secuencia génica detallada del evento de transformación (tamaño del fragmento, sitio de inserción y oligonucleótidos). | 29 |
| i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, expresión de los mensajeros con demostración de resultados..... | 33 |
| j) Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres, expresión de las proteínas y su localización. | 42 |
| k) Descripción del método de transformación..... | 54 |
| 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. | 57 |
| m) Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples. | 65 |
| n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios. | 66 |
| o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos. | 74 |
| 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. | 79 |
| q) Patogenicidad o virulencia de los organismos receptores y donadores. | 81 |
| 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. | 90 |
| s) Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgen. | 93 |
| t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados. | 95 |
| II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA O ZONAS DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM. | 95 |
| a) Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación. | 95 |
| b) Ubicación, en coordenadas UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación. | 98 |
| c) Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según características de diseminación del OGM. | 98 |
| III. ESTUDIO DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGM PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA. | 106 |
| a) Estabilidad de la modificación genética del OGM. | 106 |
| b) Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína en diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren. | 109 |

| | |
|---|------------|
| c) Características del fenotipo del OGM. | 109 |
| 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. | 110 |
| e) Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya, ciclo biológico y cambios en la morfología básica. | 111 |
| f) Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que puedan derivar de la liberación del OGM. | 113 |
| g) Descripción de uno o más métodos de identificación, niveles de sensibilidad y reproducibilidad. | 118 |
| h) Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas. | 118 |
| i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados. | 124 |
| j) Las demás que establezcan las NOM que deriven de la Ley. | 124 |
| IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD A LLEVAR A CABO. | 124 |
| a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad. | 124 |
| b) Medidas y procedimientos de bioseguridad. | 132 |
| V. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROMOVENTE. | 141 |
| a) Descripción de la zona en donde se realizó la liberación. | 141 |
| b) Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna. | 143 |
| 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). | 146 |
| 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. | 149 |
| 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. | 150 |
| 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. | 151 |
| a) Malezas en el cultivo del algodón. | 151 |
| b). Algodón genéticamente modificado tolerante a herbicidas. | 152 |
| c). Plagas del cultivo de algodón. | 165 |
| d) Algodón genéticamente modificado resistente a insectos. | 173 |
| e) Resistencia de insectos. | 175 |
| f) Alternativas al uso de algodón GM resistente a insectos. | 178 |
| g) Literatura consultada. | 180 |
| VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O DE BIORREMEDIACIÓN. | 180 |
| VIII. LA PROPUESTA DE VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA. | 180 |
| INFORMACIÓN ADICIONAL. | 180 |
| a) La cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte. | 180 |
| b) El diseño experimental que se llevará a cabo durante la liberación en etapa experimental. | 183 |
| c) Beneficio económico y ambiental de los cultivos biotecnológicos. | 183 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|-----|
| Cuadro 1. Distribución de especies de <i>Gossypium</i> en México. | 9 |
| Cuadro 2. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México. | 13 |
| Cuadro 3. Resumen de los genes insertados en los eventos parentales del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102. | 15 |
| Cuadro 4. Resumen de los elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102. | 18 |
| Cuadro 5. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México. | 26 |
| Cuadro 6. Análisis de segregación del evento GHB614. | 47 |
| Cuadro 7. Análisis de segregación del algodón T304-40 x GHB119. | 50 |
| Cuadro 8. Datos de segregación de la progenie del evento COT102. | 52 |
| Cuadro 9. Resumen de los resultados de hibridación que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón GHB614. | 58 |
| Cuadro 10. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS con otras proteínas EPSPS. | 75 |
| Cuadro 11. Elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102. | 79 |
| Cuadro 12. Resumen de los genes de selección utilizados para la obtención de los eventos parentales del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102. | 90 |
| Cuadro 13. Superficie y cantidad de semilla a importar y/o movilizar para el programa experimental de algodón GLTP durante el ciclo PV-2020. | 95 |
| Cuadro 14. Periodos de siembra regionales para el cultivo del algodón en México. | 98 |
| Cuadro 15. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México. | 99 |
| Cuadro 16. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco. | 115 |
| Cuadro 17. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco. | 116 |
| Cuadro 18. Especies de <i>Gossypium</i> reportadas en la literatura para el Norte de México. | 119 |
| Cuadro 19. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco. | 138 |
| Cuadro 20. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco. | 140 |
| Cuadro 21. Superficie sembrada con algodón <i>upland</i> ^a en Estados Unidos 2016. | 142 |
| Cuadro 22. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodón (PLM, 2006). | 149 |
| Cuadro 23. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón COT102 (OECD: SYN-IR1Ø2-7). | 150 |
| Cuadro 24. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón GHB614 (OECD: BCS-GHØØ2-5). | 151 |
| Cuadro 25. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón T304-40 x GHB119 (OECD: BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8). | 151 |
| Cuadro 26. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón. | 155 |
| Cuadro 27. Espectro de control de maleza del herbicida glufosinato de amonio. | 155 |
| Cuadro 28. Espectro de control de maleza del herbicida glifosato. | 156 |
| Cuadro 29. Consumo de combustible por el uso de tractor por tipo de labranza en Estados Unidos. | 157 |
| Cuadro 30. Ingrediente activo, formulación, dosis, categoría toxicológica y grupo químico de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón. | 161 |

| | |
|---|-----|
| Cuadro 31. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón. | 162 |
| Cuadro 32. Ventajas y desventajas de los métodos de manejo de maleza. | 164 |
| Cuadro 33. Muestreo y umbral económico de gusano bellotero y tabacalero en algodón..... | 165 |
| Cuadro 34. Muestreo y umbral económico de gusano cogollero en algodón. | 166 |
| Cuadro 35. Muestreo y umbral económico de gusano soldado en algodón. | 167 |
| Cuadro 36. Muestreo y umbral económico de gusano rosado en algodón. | 168 |
| Cuadro 37. Acuerdos por los que se declaran zonas libres de gusano rosado en México..... | 168 |
| Cuadro 38. Muestreo y umbral económico de mosquita blanca en algodón..... | 169 |
| Cuadro 39. Muestreo y umbral económico del picudo del algodón..... | 170 |
| Cuadro 40. Muestreo y umbral económico de la conchuela del algodón..... | 171 |
| Cuadro 41. Muestreo y umbral económico de la chinche lygus en algodón. | 171 |
| Cuadro 42. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón. | 175 |
| Cuadro 43. Los 20 artrópodos más importantes, para los cuales se han registrado casos de resistencia en la agricultura y la salud pública. | 177 |
| Cuadro 44. Ingrediente activo, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos plaga en algodón (PLM, 2014). | 178 |
| Cuadro 45. Superficie sembrada con cultivos biotecnológicos por país durante 2015..... | 183 |
| Cuadro 46. Algodón tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea). | 188 |
| Cuadro 47. Soya tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea). | 188 |
| Cuadro 48. Maíz tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea). | 189 |
| Cuadro 49. Canola tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea). | 189 |
| Cuadro 50. Cultivos resistentes a insectos. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea). | 189 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Distribución de especies de algodón silvestre en México. | 11 |
| Figura 2. Mapa de distribución del género <i>Gossypium</i> en México (REMIB-CONABIO, 2006). | 12 |
| Figura 3. Diagrama del desarrollo del evento GHB614. | 45 |
| Figura 4. Diagrama del desarrollo del algodón GHB614. | 46 |
| Figura 5. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40. | 48 |
| Figura 6. Diagrama del desarrollo del algodón GHB119. | 49 |
| Figura 7. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40 x GHB119 (TwinLink®). | 51 |
| Figura 8. Mapa de las generaciones del evento COT102 utilizadas para estudios de estabilidad genética. | 52 |
| Figura 9. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102. | 53 |
| Figura 10. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102. | 56 |
| Figura 11. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS. | 67 |
| Figura 12. Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> | 69 |
| Figura 13. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio. | 72 |
| Figura 14. Mecanismo de acción de la proteína PAT que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. | 73 |
| Figura 15. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio. | 92 |
| Figura 16. Mecanismo de acción de la proteína PAT/ <i>bar</i> que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. | 92 |
| Figura 17. Polígono propuesto para la liberación de algodón GLTP en etapa experimental en la región agrícola de Chihuahua Norte. | 96 |
| Figura 18. Polígono propuesto para la liberación de algodón GLTP en etapa experimental en la región agrícola de Chihuahua Sur. | 97 |
| Figura 19. Polígono propuesto para la liberación de algodón GLTP en etapa experimental en la región agrícola de la Comarca Lagunera. | 97 |
| Figura 20. Distribución puntual de <i>G. hirsutum</i> y <i>G. barbadense</i> con relación al polígono de liberación propuesto para la liberación de algodón GLTP. | 99 |
| Figura 21. Polígonos de liberación de algodón GLTP en la región de Chihuahua y Coahuila. | 102 |
| Figura 22. Áreas Naturales Protegidas cercanas a los polígonos de liberación de algodón GLTP en Chihuahua - Comarca Lagunera. | 103 |
| Figura 23. Distritos de Desarrollo Rural (DDR) comprendidos dentro del polígonos de liberación de algodón GlyTol® TwinLink® Plus. | 103 |
| Figura 24. Regiones ecológicas nivel IV que se traslapan con la región agrícola Chihuahua – Coahuila y Durango (Comarca Lagunera). | 104 |
| Figura 25. Ruta de movilización de Cd. Juárez a Delicias, Chih. | 105 |
| Figura 26. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales. | 127 |
| Figura 27. Regiones productoras de algodón de los Estados Unidos (<i>Cotton belt</i>). | 142 |
| Figura 28. Principales tipos climáticos de Estados Unidos. | 143 |
| Figura 29. 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). | 154 |
| Figura 30. Incremento cronológico en el número de malezas resistentes a herbicidas pertenecientes a distintos grupos (Heap, 2015). | 159 |

| | |
|---|-----|
| Figura 31. Número de especies resistentes a herbicidas por cultivo (Heap, 2015). | 163 |
| Figura 32. Número de especies resistentes a herbicidas individuales (Heap, 2015)..... | 164 |
| Figura 33. Gusano bellotero (<i>Helicoverpa zea</i>)..... | 166 |
| Figura 34. <i>Gusano cogollero (Spodoptera frugiperda)</i> | 166 |
| Figura 35. Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>)..... | 167 |
| Figura 36. Gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>). | 168 |
| Figura 37. Mosquita blanca (<i>Bemisia argentifolii</i>)..... | 169 |
| Figura 38. Picudo del algodnero (<i>Anthonomus grandis</i>). | 170 |
| Figura 39. Conchuela del algodón (<i>Chlorochroa ligata</i> Say)..... | 171 |
| Figura 40. Chinche Lygus (<i>Lygus</i> spp.)..... | 172 |
| Figura 41. Daño por trips en el cultivo del algodón. | 172 |
| Figura 42. Pulgón del algodón (<i>Aphis gossypii</i>). | 173 |
| Figura 43. 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)..... | 174 |
| Figura 44. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales. | 182 |
| Figura 45. Adopción global de los principales cultivos biotecnológicos durante 2015. | 184 |
| Figura 46. Adopción global de cultivos biotecnológicos por característica 1996 - 2015. | 185 |
| Figura 47. Impacto de la adopción de cultivos biotecnológicos 1996 - 2014. | 186 |

Artículo 5. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

1. Nombre, denominación o razón social de quien promueve.

BASF Mexicana S.A. de C.V.

Artículo 16. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados

I. CARACTERIZACIÓN DEL OGM.

a) Identificador único del evento de transformación.

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

Otras designaciones:

Algodón **GLTP**

Algodón GLTC

Algodón GlyTol® TwinLink® Plus

Algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102

Algodón BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7

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

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

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

Las especies silvestres y cultivadas del género *Gossypium* pertenecen a la familia Malvaceae. Este género contiene 50 especies con un número cromosómico básico de 13. De las especies descritas,

¹ <http://bch.biodiv.org/>

² <http://www2.oecd.org/biotech/>

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

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 & 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 anfidiplóide⁴ (AADD, $2n=4x=52$) produjo híbridos fértiles cuando fue cruzado con especies tetraploides americanas (Milton & Allen, 1995).

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.

Distribución en México: la distribución del género *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; Figura 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. Nayarit: Nayar, Jesús María, ribera del Río Santiago, Tepic, Pochichitlan y Agua Milpa. Sinaloa: Mocorito, El Caimanero, Rancho Viejo, Cofradía y Culiacán. Veracruz: Actopan. Puebla: Tecamatlán, Jolalpan, San Pedro de las Palmas, Tecuautitlán San Martín. |

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

| | |
|------------------------|--|
| <i>G. armourianum</i> | Baja California: Golfo de California e Isla San Marcos. |
| <i>G. davidsonii</i> | Baja California: Arroyo Salado, ribera del Río La Purísima, Sierra de la Giganta, Los Cabos, Santa Anita y La Paz. Sonora: Guaymas. |
| <i>G. gossypioides</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. 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, Ajoja. |
| | 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.

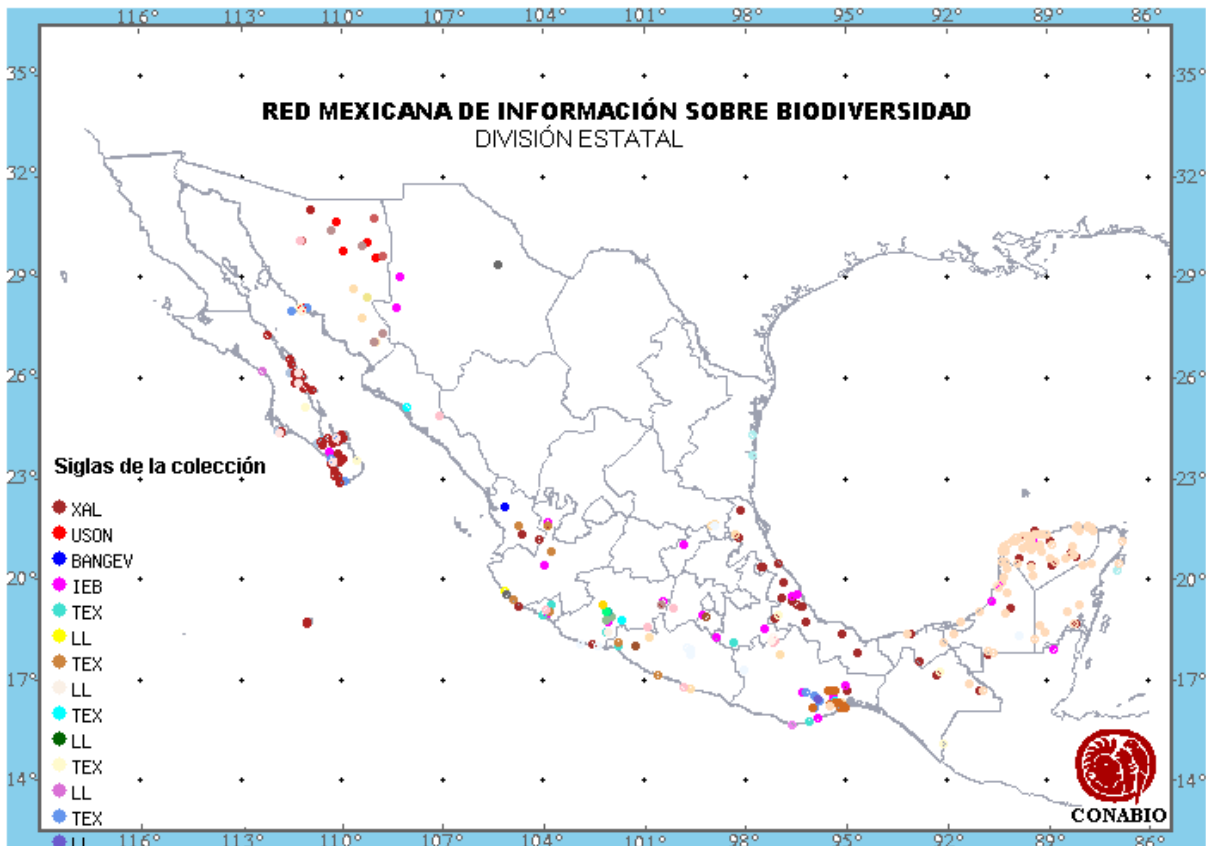


Fuente: Fryxell (1979); Herbario Nacional "MEXU" (1998) del Instituto de Biología de la UNAM.

Adicionalmente, se realizó una búsqueda en la **Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB)** ⁵, 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](#)).

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

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



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

Bases de datos consultadas:

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

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

c) Especificación de la existencia de especies sexualmente compatibles.

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

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

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

Las especies silvestres reportadas para México son diploides ($2n=2x=26$) y, por lo tanto, no son sexualmente compatibles 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.

d) Descripción de los hábitats donde el OGM puede persistir o proliferar.

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 altitudes dentro del 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, en los cuales se evalúa el vigor inicial del cultivo, población inicial (plantas/ha), inicio de floración, altura total, número de nudos, día en que aparece la primera flor, día en que aparecen las bellotas, día en que aparecen los primeros capullos, mapeo final, altura final de la planta, nudos totales, bellotas totales, población final de plantas, tolerancia al chorreado, enfermedades y cosecha (peso de algodón hueso), entre el algodón GlyTol® TwinLink® Plus y el convencional, se ha concluido que el algodón GlyTol® TwinLink® Plus no es diferente al algodón convencional, por lo que los hábitats donde puede persistir y proliferar se pueden considerar similares a los de variedades de empleo agrícola.

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 C₃⁶.

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

Humedad ambiental: resiste atmósferas secas, siempre que no falte humedad en el suelo.

Temperatura: requiere una temperatura mínima y máxima con umbrales de 12.8°C y 30°C, respectivamente. Para apertura de bellotas se requiere por lo menos una temperatura de 15°C y para su desarrollo una de 27 a 43 °C. El rango óptimo para fotosíntesis es de 25 - 30°C. Para obtener buenos rendimientos, la temperatura mínima 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.

Luz: requiere días soleados, los cuales son especialmente importantes durante la floración. La intensidad de luz óptima para su desarrollo es de 32.3 - 86.1 klux.

⁶ 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.

Requerimientos de suelo:

- **Textura de suelo:** migajón a franco-arcilloso y franco limoso, preferentemente no calcáreo.
- **Profundidad de suelo:** 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:** tolera tanto 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:** el rango de pH para un buen crecimiento y desarrollo va de 4.8 a 7.5, con un óptimo de 5.6.

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

1. Organismo receptor.

El organismo receptor para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 es la variedad de algodón (*Gossypium hirsutum*). El algodón es un miembro de la familia Malvaceae, a continuación, se presenta la clasificación taxonómica del algodón.

| | |
|---------------|--|
| 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/>).

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

Los organismos donadores de los genes presentes en el evento combinado mediante cruzamiento convencional algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se presentan en el Cuadro 3.

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

| Evento | Gen | Organismo donador | Producto del gen | Función |
|---------|----------------|--|---|--|
| GHB614 | <i>2mepsps</i> | Maíz (<i>Zea mays</i>) | Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (mEPSPS) tolerante a glifosato | Disminuye la afinidad con el glifosato y, por lo tanto, aumenta la tolerancia a este herbicida |
| T304-40 | <i>cry1Ab</i> | Bacteria (<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>) | Delta-endotoxina Cry1Ab | Confiere resistencia a insectos lepidópteros al dañar su intestino medio |

| | | | | |
|--------|--------------------|--|---|---|
| | <i>bar</i> | Bacteria (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) | Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT) | Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación |
| GHB119 | <i>cry2Ae</i> | Bacteria (<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i>) | Delta-endotoxina Cry2Ae | Confiere resistencia a insectos lepidópteros al dañar su intestino medio |
| | <i>bar</i> | Bacteria (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) | Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT) | Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación |
| COT102 | <i>vip3Aa19</i> | Bacteria (<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa AB88) | Proteína vegetativa insecticida Vip3Aa19 | Confiere resistencia a insectos lepidópteros al dañar su intestino medio |
| | <i>aph4 (hptI)</i> | Bacteria (<i>Escherichia coli</i>) | Enzima hygromycin-B phosphotransferase (hph) | Marcador de selección mediante resistencia al antibiótico Higromicina B |

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

3.1. Maíz (*Zea mays*).

El maíz es uno de los granos de mayor cultivo en todo el mundo, con un largo historial de uso seguro en alimentación/uso humana y animal. Se cultiva comercialmente en más de 100 países. Los principales productores de maíz son Estados Unidos, China, Brasil, México, Francia y Argentina. Es un producto alimenticio básico en México y el consumo nacional *per cápita* 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%.

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| 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. *Bacillus thuringiensis*.

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

Un gran número de subespecies de *B. thuringiensis* se han aislado de larvas muertas principalmente del orden coleóptera, díptera y lepidóptera, pero muchas de las subespecies se han aislados del suelo, de las superficies de hojas y de otros hábitats. Los insectos muertos frecuentemente contienen grandes cantidades de esporas y cristales que pueden entrar al ambiente. Las subespecies de *Bt* que son activas contra coleópteros y lepidópteros están asociadas con el suelo y la superficie de hojas, mientras que las subespecies activas contra dípteros se encuentran comúnmente en

ambientes acuáticos. En el ambiente, las esporas persisten y el crecimiento vegetativo podría ocurrir cuando las condiciones son favorables y los nutrientes están disponibles.

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

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

3.3. *Streptomyces 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 estreptomicina.

En el caso de la especie *S. 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>)

3.4. *Escherichia coli*.

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

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

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

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

3.5. Historial de uso seguro de los organismos donantes.

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

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

4. Identificación de los organismos donadores de secuencias reguladoras.

Cada gen transferido al algodón requiere de secuencias reguladoras que permitan su transcripción en RNA y su posterior traducción en forma óptima. Las secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes introducidos en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se presentan en el Cuadro 4. Aunque algunas secuencias reguladoras se derivan de patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV), virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV), estas secuencias no tienen capacidad de inducir enfermedades en el algodón.

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

| Evento | Gen | Secuencia reguladora | Organismo donador de la secuencia reguladora | Función |
|--------|----------------|----------------------|--|---|
| GHB614 | <i>2mepsps</i> | Ph4a748At | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Promotor constitutivo |
| | | intron1 h3At | <i>Arabidopsis thaliana</i> | <i>Intron</i> del gen II de la histona variante H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| | | TPotp C | <i>Zea mays/ Helianthus annuus</i> | Péptido de tránsito que dirige la translocación de la proteína a los cloroplastos |
| | | 3'histonAt | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción) |

| | | | | |
|---------|-------------|------------|--|--|
| T304-40 | cry1Ab | 5'e1-Ps7s7 | Virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV)/ <i>Oriza sativa</i> | Promotor |
| | | 3'me1 | <i>Flaveria bidentis</i> | Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción) |
| | bar | P35S3 | Virus del mosaico de la coliflor (CaMV) | Promotor constitutivo |
| | | 3'nos | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción) |
| GHB119 | cry2Ae | P35S3 | Virus del mosaico de la coliflor (CaMV) | Promotor constitutivo |
| | | TPssuAt | <i>Arabidopsis thaliana/ Petunia hybrida</i> | Péptido de tránsito |
| | | 3'35s | Virus del mosaico de la coliflor (CaMV) | Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción) |
| | bar | Pcsmv XYZ | Virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV) | Promotor constitutivo |
| | | 3'nos | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción) |
| | | | | |
| COT102 | vip3Aa19 | Act2 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Promotor constitutivo |
| | | 3'nos | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción) |
| | aph4 (hptI) | Ubq3int | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Promotor constitutivo |
| | | 3'nos | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Señal de poliadenilación (terminación de la transcripción) |

4.1. *Agrobacterium tumefaciens*.

Es una bacteria aeróbica en forma de bacilos, gram-negativa, flagelada, peritrica; forma colonias mucoides y blancas.

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. 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*.

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, utilizada en biología molecular como planta modelo para dicotiledóneas

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. 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. 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 cápita* 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 se reportó que el grano de maíz, consumido en forma de tortillas, constituía un 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. Girasol (*Helianthus annuus*).

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

Es una planta herbácea, anual, de gran porte, que puede alcanzar los 2 m de altura. Para su óptimo desarrollo necesita de una gran cantidad de horas de insolación y mucha humedad. Posee hojas de forma triangular, ásperas al tacto. Los frutos, que popularmente se denominan "pipas", son grandes, de unos 2 cm de largo y de color blanco, gris o negro, según la variedad de que se trate. La floración se produce en los meses de verano. Las inflorescencias son muy grandes. La recolección se efectúa cuando las semillas están maduras (www.oleaginosas.org).

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

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

4.5. Arroz (*Oryza sativa*).

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

La planta del arroz tiene un tallo cilíndrico formado de nudos y entrenudos alternados con hojas seguidos de secciones sin ellas. Su altura va desde sesenta hasta 120 cm. Las hojas son largas y planas. En el punto donde la hoja se une al tallo, hay una lígula con una serie de cirros largos y sedosos. Las flores del arroz son de color verde blanquecino dispuestas en espiguillas, que en conjunto se denominan panoja. Una vez que ha floreado, las espigas son estrechas y colgantes. El

grano de arroz es el ovario maduro. Cuando se le quita la cáscara pardusca o pericarpio, se dice que se ha pulido. De otra forma, se trata de arroz integral, preferido por muchas personas por su alto contenido de fibra (www.siap.gob.mx).

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

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

4.6. *Flaveria bidentis*.

Es una planta anual con una altura de alrededor de 50 cm; su tallo es generalmente de color púrpura; hojas opuestas, sésiles, angostas, de hasta 5 cm de largo y hasta 0.6 cm de ancho, a veces con el margen aserrado. Las flores se agrupan en cabezuelas apretadas sobre numerosos ejes cuyo ápice tiende a enroscarse, ubicados hacia la punta de los tallos formando una inflorescencia de aspecto redondeado. Cada inflorescencia está formada por 5 a 11 flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo pequeño que no presenta brácteas (páleas), el conjunto de flores está rodeado por fuera por 5 brácteas (que constituyen el involucre) oblongo-ovadas o con forma de "lancha". El fruto es un aquenio y no se abre (indehiscente), contiene una sola semilla, es más o menos cilíndrico, aunque a veces algo más ancho hacia el ápice, algo comprimido y acostillado, mide aproximadamente 1 mm de largo (cuando se presenta, el fruto de la flor ligulada es ligeramente más largo), sin vilano (www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/).

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

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

4.7. *Petunia hybrida*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Semilla (variedades FiberMax™ y Stonville™)

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

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

1. Origen y diversificación del algodón.

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

Además de las 45 especies diploides, existen cinco especies alotetraploides ($2n=4x=52$) originarias del Nuevo Mundo, de las cuales cuatro son originarias del continente americano y una de Hawai. Las especies alotetraploides contienen la combinación de los genomas **AADD** y tienen 26 cromosomas largos y 26 cromosomas chicos, aunque existe algún traslape en tamaño entre los cromosomas de los genomas **A** y **D**. El origen genético de las especies alotetraploides fue demostrado experimentalmente cruzando *G. arboreum* (genoma **A**), especie diploide cultivada en la India, y *G. thurberi* (genoma **D**), especie diploide silvestre de América, y duplicando los cromosomas del híbrido estéril con colchicina. El híbrido anfidiplóide⁷ (**AADD**, $2n=4x=52$) produjo híbridos fértiles cuando fue cruzado con especies tetraploides americanas. Dos especies diploides y dos tetraploides de *Gossypium* son las especies cultivadas actualmente (Milton and Allen, 1995):

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

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

En México y Australia se localizan 29 de las especies conocidas, 13 son de México. Estas se encuentran distribuidas en toda la zona costera del Océano Pacífico y en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Veracruz. En 1905 investigadores extranjeros iniciaron expediciones formales para coleccionar la variabilidad genética de *Gossypium* existente en nuestro país. A la fecha se tienen registradas 16 expediciones, siete de ellas a partir de 1975, año en que por primera vez se contó con la participación de investigadores nacionales. México ha participado en seis expediciones en que se cubrieron todas las regiones donde existe algodón nativo, lográndose coleccionar todas las especies y razas de *G. hirsutum*, excepto una, la raza *G.h. latifolium*, la que parece estar 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

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

Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), se reportan las siguientes especies de *Gossypium* para la región Norte de México (cuadro 5).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

G. turneri Fryxell, se localiza en la costa de Sonora, cerca de la bahía de San Carlos. La hoja es someramente trilobulada, entera, con casi el mismo largo y ancho, y caduca. La flor es de un color amarillo brillante y presenta una pequeña mancha rojiza en la base. La cápsula tiene de tres a cinco

lóculos y es de forma redonda a ovoide. La semilla mide de 7 a 8 mm de longitud y está cubierta por pubescencias (fibra) muy cortas.

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

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

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).

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*, *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.

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

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

En un estudio más reciente (Ulloa *et al.*, 2006) 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. gossypioides*, *G. hirsutum*, *G. laxum*, *G. lobatum* y *G. schwendimanii*. La conservación *in situ* de algunas de estas especies también se encuentra seriamente amenazada por las actividades humanas.

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a 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 anthesis. 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.

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.

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

1. Cuádruple apilado GLTP (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).

El algodón **GLTP** fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614, T304-40 x GHB119 de Bayer y el evento COT102 de Syngenta (bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta). 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 T304-40 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de las proteínas Cry1Ab de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. De igual manera, el evento GHB119 se produjo a través de la inserción estable en el genoma del algodón de las secuencias codificantes para las proteínas Cry2Ae de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína Vip3Aa19

de *B. thuringiensis* cepa AB88. La combinación de estos eventos en el algodón GLTP provee protección contra daños de insectos lepidópteros y 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, T304-40, GHB119 y COT102 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. De igual manera se comprobó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GLTP.

Para evaluar la estabilidad de los insertos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 en el evento apilado GLTP, el DNA genómico de plantas de algodón GLTP fue dirigido con enzimas de restricción, después de la hibridación con las sondas correspondientes, se determinó que todas las plantas de algodón GLTP analizadas, mostraron fragmentos de tamaño comparable a los fragmentos obtenidos de las líneas parentales individuales para cada inserto.

En adición a los análisis de integridad y estabilidad estructural descritos anteriormente, se determinaron los niveles de expresión de proteína de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 en los eventos parentales, así como en el evento apilado GLTP en raíz, hoja, cuadros, bellotas, polen y semilla, en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V6, inicio de cuadros, floración y madurez). En dicha evaluación se encontró que los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 son similares entre el evento apilado GLTP y los correspondientes parentales.

Se llevó a cabo la evaluación agronómica y fenotípica del algodón GLTP en ensayos de campo establecidos en diferentes regiones representativas del cultivo del algodón en los Estados Unidos durante el año 2013. Los resultados de estas evaluaciones indicaron que los valores de las variables evaluadas en el algodón GLTP están dentro del rango determinado para las variedades comerciales de referencia (convencionales), lo que demuestra la equivalencia agronómica y fenotípica del algodón GLTP en relación con el convencional.

En adición al estudio de características agronómicas y fenotípicas, se analizó la característica de germinación de la semilla de algodón GLTP y convencional (FM966), mediante las pruebas de germinación estándar y germinación en fríos los datos demostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas para la variable de germinación entre algodón GLTP y convencional FM966.

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.

3. Evento T304-40.

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

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

Como resultado del evento de transformación se crearon cuatro nuevas uniones, dos localizadas en los extremos 5' y 3' del inserto y dos localizadas dentro del inserto debido a un rea-arreglo.

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

4. Evento GHB119.

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

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

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

5. Evento COT102.

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

La alineación de la secuencia transgénica del evento COT102 con la secuencia del vector pCOT1 resultó en una alineación exacta para todos los elementos genéticos funcionales contenidos dentro del T-DNA. Durante el proceso de transformación del algodón Coker 312 para producir el evento COT102, se truncaron algunas secuencias de los bordes. En la secuencia del borde izquierdo fueron truncados 19-25 bp y en el borde derecho de 25 – 24 bp. Estas delecciones no tienen ningún impacto

en la expresión de las proteínas APH4 o Vip3Aa19 (VIP3A), este fenómeno ha sido observado previamente en transformaciones genéticas mediadas por *Agrobacterium* y ha sido reportado en la literatura científica (Tinland and Hohm, 1995).

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

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

Los fragmentos de DNA insertados en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 corresponden a los que contienen sus eventos parentales individuales. Por lo tanto, las características de las inserciones y secuencias flanco 5' y 3' están conservados en este evento apilado. Los componentes individuales y el tamaño, fuente y función de las secuencias heredadas de los eventos individuales comprendidos en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se describen en la **sección I.i.2**.

1. Secuencias flanqueantes.

1.1. Cuádruple apilado (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).

El algodón GLTP fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614, T304-40 x GHB119 de Bayer y el evento COT102 de Syngenta (bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta). 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 T304-40 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de las proteínas Cry1Ab de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. De igual manera, el evento GHB119 se produjo a través de la inserción estable en el genoma del algodón de las secuencias codificantes para las proteínas Cry2Ae de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *S. hygroscopicus*. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína Vip3Aa19 de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88. La combinación de estos eventos en el algodón GLTP provee protección contra daños de insectos lepidópteros y 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, T304-40, GHB119 y COT102 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 inidividuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GLTP. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos

individuales fueron determinadas previamente (Habex & Lecleir, 2014⁹; Moens & Criel, 2008¹⁰; Habex, 2011¹¹; Artim *et al.*, 2003¹²) y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GLTP. 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 GLTP contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

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.

1.3. Evento T304-40.

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

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 Moens, S.; Criel, S. 2008. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40. Bayer BioScience N.V. Belgium. M-311245-05-1.

¹¹ Habex, V. 2011. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119. Bayer BioScience N.V. Belgium. M-308404-03-1.

¹² Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.

de la secuencia transgénica insertada, utilizando DNA genómico del algodón convencional Cocker 315 como plantilla. Se obtuvo una secuencia consenso derivada de los cinco fragmentos del evento T304-40 y se preparó una secuencia consenso que contenía las secuencias del algodón convencional (*Gossypium hirsutum*) en el sitio de integración.

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

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

1.4. Evento GHB119.

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

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

La secuencia del *locus* transgénico determinada consiste de 358 bp de la secuencia flanco 5', 4302 bp de la secuencia transgénica integrada y 320 bp de la secuencia flanco 3'. La secuencia insertada es totalmente idéntica a la secuencia del T-DNA del vector pTEM12. Asimismo, se determinó la secuencia del *locus* de pre-inserción que contiene 684 bp, incluyendo 367 bp de la secuencia flanco 5', 309 bp de la secuencia flanco 3' y 8 bp del sitio blanco de delección. Las secuencias flanqueantes

5' y 3' determinadas en el *locus* transgénico son totalmente idénticas a las secuencias 5' y 3' determinadas en el *locus* de algodón convencional, lo que demuestra que las secuencias flanco del algodón GHB119 corresponden exactamente al genoma de *Gossypium hirsutum*.

1.5. Evento COT102.

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

El número de copias del T-DNA del plásmido pCOT1 insertadas en el genoma del algodón, la integridad de las secuencias codificantes *vip3Aa19* y *aph4*, la integridad de los *cassettes* de expresión de *vip3Aa19* y *aph4*, así como la confirmación de la ausencia del esqueleto del plásmido en el algodón fueron determinados mediante análisis *Southern Blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (*vip3Aa*, *aph4*, promotor actin-2, promotor ubiquitin-3, gen *Spec*, gen RepA, VS1 ori, ColE1 ori) como sondas. Los resultados del análisis indican que el evento COT102 contiene únicamente una copia intacta del T-DNA del plásmido pCOT101, asimismo los resultados confirman la ausencia de cualquier otra secuencia de DNA fuera de los bordes del T-DNA del vector pCOT1 (Artim *et al.*, 2003¹³).

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

2. Número de copias.

2.1. Cuádruple apilado (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).

El algodón GLTP fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614, T304-40 x GHB119 de Bayer y el evento COT102 de Syngenta (bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta). 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 T304-40 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de las proteínas Cry1Ab de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. De igual manera, el evento GHB119 se produjo a través de la inserción estable en el genoma del algodón de las secuencias codificantes para las proteínas Cry2Ae de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *S. hygroscopicus*. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína Vip3Aa19 de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88. La combinación de estos eventos en el algodón GLTP provee protección contra daños de insectos lepidópteros y 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, T304-40, GHB119 y COT102 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,

¹³ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.

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, T304-40, GHB119 y COT102, confirmo la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GLTP. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente (Habex & Leclair, 2014¹⁴; Moens & Criel, 2008¹⁵; Habex, 2011¹⁶; Artim *et al.*, 2003¹⁷) y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GLTP. 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 GLTP contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

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 histonAt), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas. 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.

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 P³² que contenían cada elemento genético presente en el vector pTEM2. También se utilizó una quinta sonda marcada con P³² para cubrir la longitud total del T-DNA. Los carriles en el

¹⁴ 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.

¹⁵ Moens, S.; Criel, S. 2008. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40. Bayer BioScience N.V. Belgium. M-311245-05-1.

¹⁶ Habex, V. 2011. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119. Bayer BioScience N.V. Belgium. M-308404-03-1.

¹⁷ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.

gel de agarosa contenían aproximadamente 10 µg 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 µg 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.

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).

2.3. Evento T304-40.

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

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

Para determinar el inserto (número de *loci* de integración en el genoma del algodón) y número de copias (número de transgenes en un *locus* individual), los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con siete sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética o el T-DNA completo.

Los resultados del análisis de hibridación *Southern blot* obtenidos del DNA genómico del algodón T304-40 y FM966 (control negativo), muestran que únicamente una copia casi completa del T-DNA, flanqueada por una copia incompleta invertida del *cassette* del gen *cry1Ab* y un terminador 3'me1 adicional, fueron transferidos al algodón T304-40 (Scott *et al.*, 2006).

2.4. Evento GHB119.

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

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

Para determinar el inserto (número de *loci* de integración en el genoma del algodón) y número de copias (número de transgenes en un *locus* individual), los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con siete sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética, o el T-DNA completo.

Los resultados del análisis de hibridación *Southern blot* obtenidos del DNA genómico del algodón GHB119 y FM 966 (control negativo), muestran la presencia de un fragmento de integración 5' y un fragmento de integración 3'; asimismo el patrón y tamaño de los fragmentos observados en el análisis de hibridación, comparados con los fragmentos esperados de la digestión de DNA, permiten concluir que se integró únicamente una copia del T-DNA del vector pTEM12 en el algodón GHB614 y que el DNA transferido al algodón corresponde a la misma configuración diseñada en el vector de transformación (Scott *et al.*, 2006).

2.5. Evento COT102.

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

El número de copias del T-DNA del plásmido pCOT1 insertadas en el genoma del algodón, la integridad de las secuencias codificantes *vip3Aa19* y *aph4*, la integridad de los *cassettes* de expresión de *vip3Aa19* y *aph4*, así como la confirmación de la ausencia del esqueleto del plásmido en el algodón fueron determinados mediante análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (*vip3Aa*, *aph4*, promotor actin-2, promotor ubiquitin-3, gen *Spec*, gen RepA, VS1 ori, Cole1 ori) como sondas. Los resultados del análisis indican que el evento COT102 contiene únicamente una copia intacta del T-DNA del plásmido pCOT101, asimismo los resultados confirman la ausencia de cualquier otra secuencia de DNA fuera de los bordes del T-DNA del vector pCOT1 (Artim *et al.*, 2003¹⁸).

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

¹⁸ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.

3. Expresión de RNA mensajero (mRNA).

3.1. Algodón GLTP.

La tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, así como la resistencia a insectos lepidópteros en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 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*, mientras que la resistencia a insectos lepidópteros es conferida por la expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19. 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, T304-40, GHB119 y COT102 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 esto se relacionan 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 GLTP 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*; así como resistencia a insectos lepidópteros por la expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ab y Vip3Aa19), 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 GLTP, 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 GLTP con los eventos apilados GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se obtuvo mediante cruzamiento convencional de eventos independientes, GHB614, T304-40 x GHB119 y COT102, el inserto de cada una de las secuencias conferidas se encuentra incorporado en un sitio independiente.

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

Como era de esperarse, los niveles de expresión de la proteína PAT/*bar* en el producto apilado GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102, es más alta que en los eventos parentales, lo cual es

atribuible a la presencia de dos copias del gen *bar* en elemento apilado, una copia proveniente del evento T304-40 y otra copia proveniente del evento GHB119.

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*.

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:

- 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 espectinomycin, para selección del plásmido en *E. coli* y *A. 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.

1.2. Evento T304-40.

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

La estructura del vector contiene los siguientes elementos genéticos:

- El núcleo del plásmido que contiene el origen de replicación del plásmido pBR322 (Bolívar *et*

al., 1977) para la replicación en *Escherichia coli* (ORI Co1E1) y un fragmento de restricción que contiene el origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.*, 1984) para la replicación en *Agrobacterium tumefaciens* (ORI pVS1).

- Un gen marcador de selección (*aadA*) que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina para la propagación y selección del plásmido en *E. coli* y *A. tumefaciens*.
- Una región de DNA que consiste en un fragmento de neomicin fosfotransferasa que codifica la secuencia del gen *nptI* del transposón Tn903 (Oka *et al.*, 1981).

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

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

1.3. Evento GHB119.

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

La estructura del vector contiene los siguientes elementos genéticos:

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

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

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

1.4. Evento COT102.

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

está regulado por el promotor ubiquitin- de *Arabidopsis*. La expresión del gen *aph4* permite el crecimiento de las células transformadas en un medio de crecimiento que contiene higromicina B.

Solamente los elementos genéticos comprendidos entre las regiones del borde izquierdo y derecho del plásmido pCOT1, son los que se transfirieron e integraron en el genoma de la célula de la planta, mientras los elementos genéticos fuera de estas regiones borde no fueron transferidos. El vector también contiene elementos bien caracterizados de DNA necesarios para la selección y replicación del plásmido en bacterias (Artim et al.; 2003 19):

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

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

2. Tipo de herencia de los caracteres.

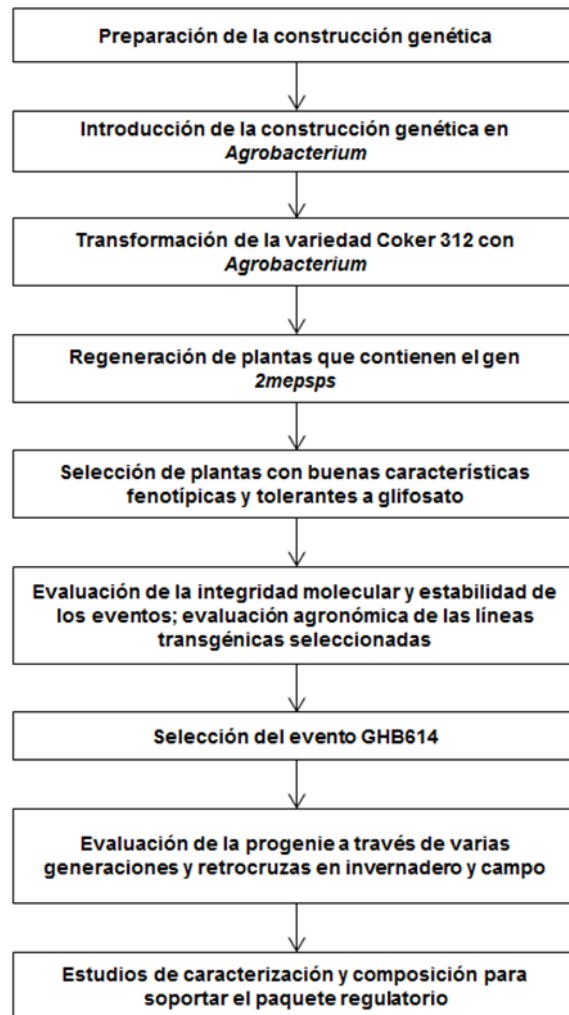
El estudio de estabilidad molecular mediante PCR y el análisis de los datos de segregación, permitieron concluir que los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 segregan de manera independiente siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante.

2.1. Evento GHB614.

El algodón GHB614 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 312 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens* como se describe en la sección k.1. La semilla T₁ obtenida de plantas autopolinizadas T₀ que sobrevivieron a la aspersión del herbicida glifosato, fue sembrada en invernadero para incremento de semilla y evaluación. Las plantas T₁ fueron seleccionadas por su tolerancia al glifosato y en cada generación, las plantas de algodón fueron asperjadas con glifosato para eliminar las que no expresaban el gen *2mepsps*. Las plantas homocigóticas T₃ se identificaron plantando 25 semillas y asperjándolas con glifosato para identificar los lotes de semillas segregantes. También se realizó un análisis de homocigosidad basado en PCR, como segundo método para identificar las plantas homocigóticas. La semilla homocigótica T₃ autopolinizada (sin segregación para tolerancia) se utilizó para producir semillas T₄ homocigóticas, y fue el origen de las líneas que se utilizaron en los primeros estudios agronómicos y de estabilidad de la transformación (Figura 3).

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

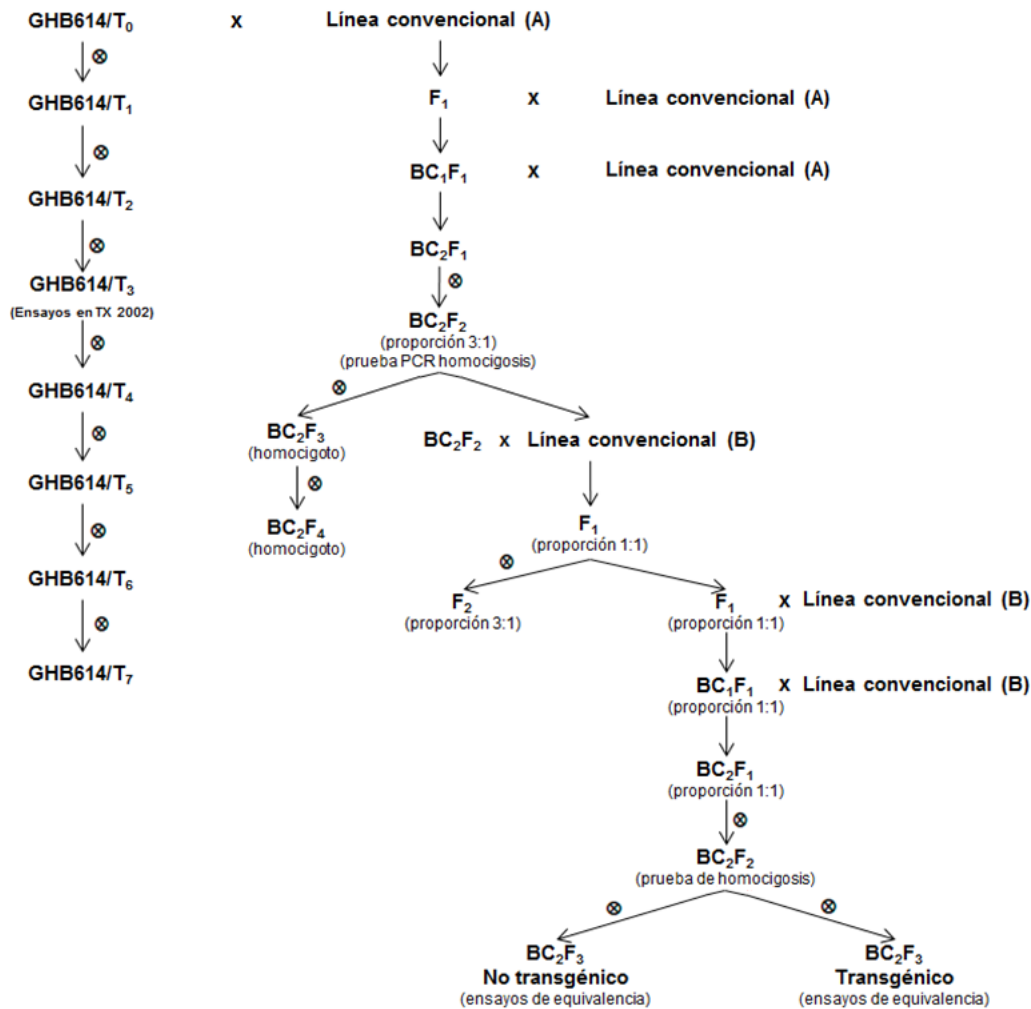
Figura 3. Diagrama del desarrollo del evento GHB614.



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), a los 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, se cruzaron plantas T_0 con algodón convencional y las plantas resultantes F_1 fueron evaluadas en invernadero. El material BC_1F_1 fue sembrado en invernadero y retrocruzado con el mismo parental recurrente (Figura 4). El material BC_2F_1 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 BC_2F_1 . Adicionalmente, la progenie BC_2F_2 debería producir 3 plantas resistentes por cada planta susceptible (Cuadro 6). En resumen, todos los datos y análisis realizados indican que el evento GHB614 se comporta como un alelo simple en un *locus* único.

Figura 4. 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.
- 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 6. 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 Homocigocidad 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.

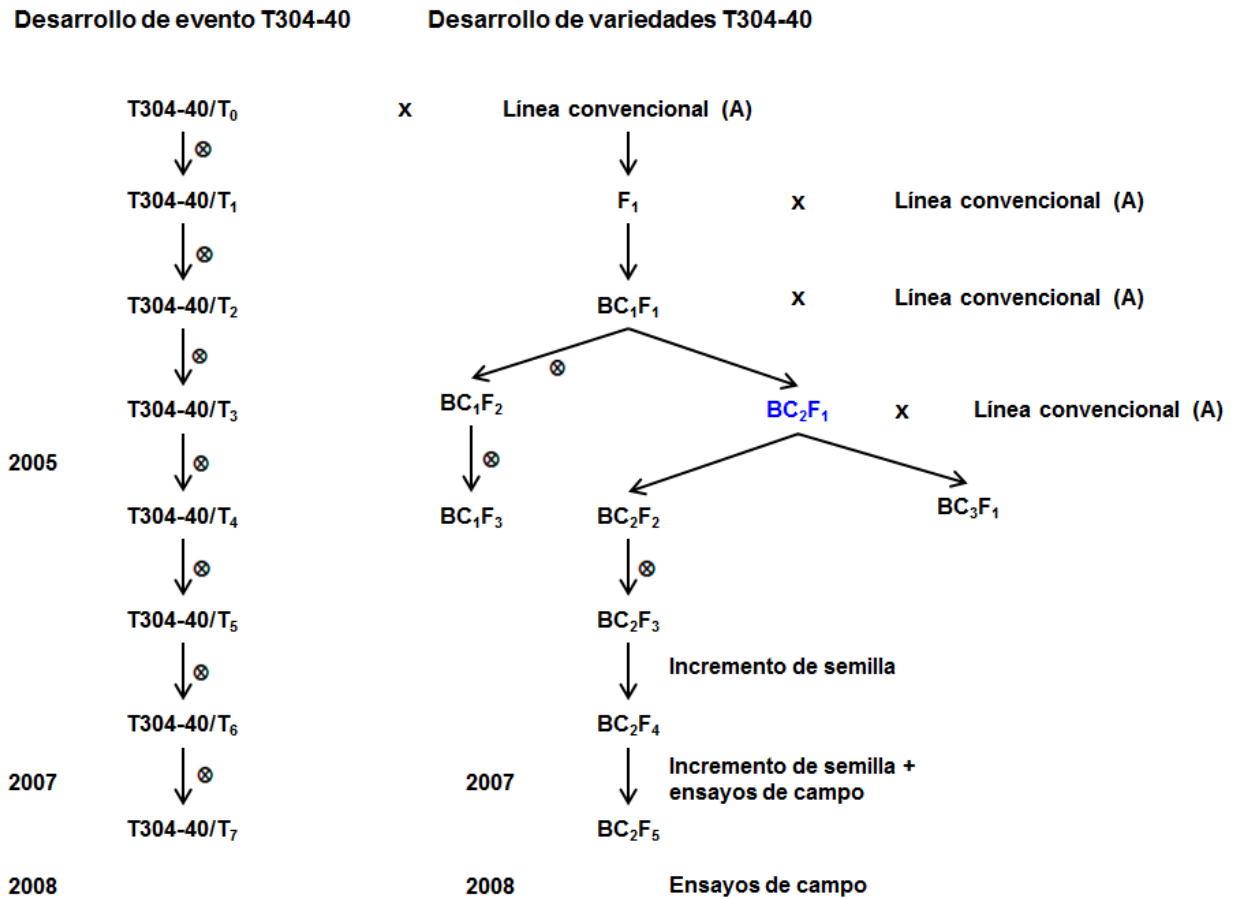
2.2. Evento T304-40.

El algodón T304-40 se obtuvo mediante la transformación genética de la variedad de algodón Coker 315 con el sistema *Agrobacterium tumefaciens*, como se describe en la sección k.2.

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

En la fase inicial de desarrollo, se eligió un número de líneas (plantas) T₀ con potencial y a partir de estas plantas se realizó una serie de autopolinizaciones y selección de plántulas mediante la aspersión de glufosinato de amonio para reducir el número de líneas. Este proceso se repitió hasta la generación T₇. Al final de este proceso se seleccionó la línea con el evento T304-40 con base en su desempeño agronómico y expresión de los dos genes introducidos para programas de mejoramiento comercial (Figura 5).

Figura 5. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40.



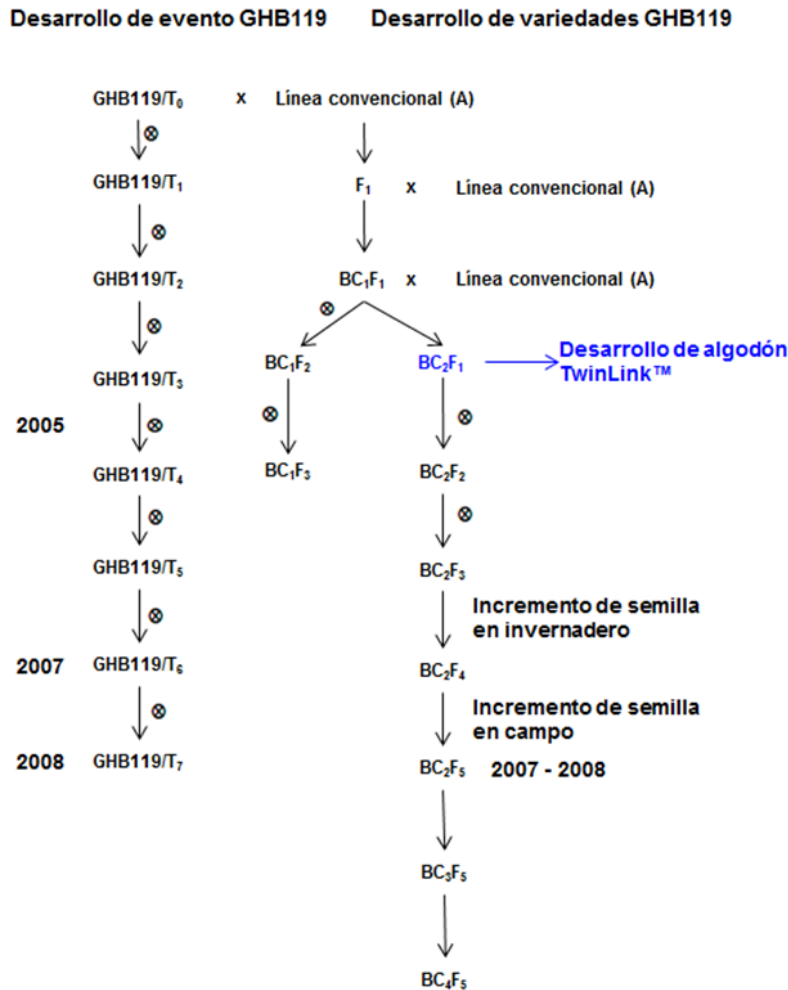
2.3. Evento GHB119.

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

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

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

Figura 6. Diagrama del desarrollo del algodón GHB119.



2.4. Evento T304-40 x GHB119.

El algodón T304-40 x GHB119 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales individuales T304-40 y GHB119 como se ilustra en la Figura 7. No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

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

La semilla homocigótica T₃ autopolinizada (sin segregación para tolerancia) se utilizó para producir semillas T₄ homocigóticas, y fue el origen de las líneas que se utilizaron en los primeros estudios

agronómicos y de estabilidad de la transformación (2005). Plantas T₆ y T₇ autopolinizadas fueron utilizadas para estudios agronómicos en 2007 y 2008. La semilla T304-40 x GHB119 (plantas F₂ individuales), fueron analizadas mediante PCR para confirmar la presencia de ambos eventos, llevadas a madurez, cosechadas (2007) y autopolinizadas para producir semilla para estudios de campo en 2008.

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

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

Para demostrar la herencia independiente de los eventos T304-40 y GHB119 se analizaron los datos de segregación de la progenie F₂. Los dos eventos fueron retrocruzados de manera independiente con una línea de algodón convencional. En la generación BC₂F₁ los dos eventos fueron combinados y la progenie de esta F₁ fue analizada para homocigosidad mediante PCR diseñada para identificar la cigocidad en cada planta F₂ individual. En las plantas individuales se analizó la presencia o ausencia de los eventos, lo cual permitió identificar cuatro posibles genotipos WT (tipo silvestre) /WT, T304-40/WT, GHB119/WT y T304-40/GHB119 (Cuadro 7). Las plantas que fueron detectadas con los dos eventos, T304-40/GHB119, fueron dejadas hasta la madurez y su semilla fue cosechada para realizar más estudios. Estos resultados complementan el análisis de DNA, caracterizando a los eventos individuales y demostrando la estabilidad de los transgenes.

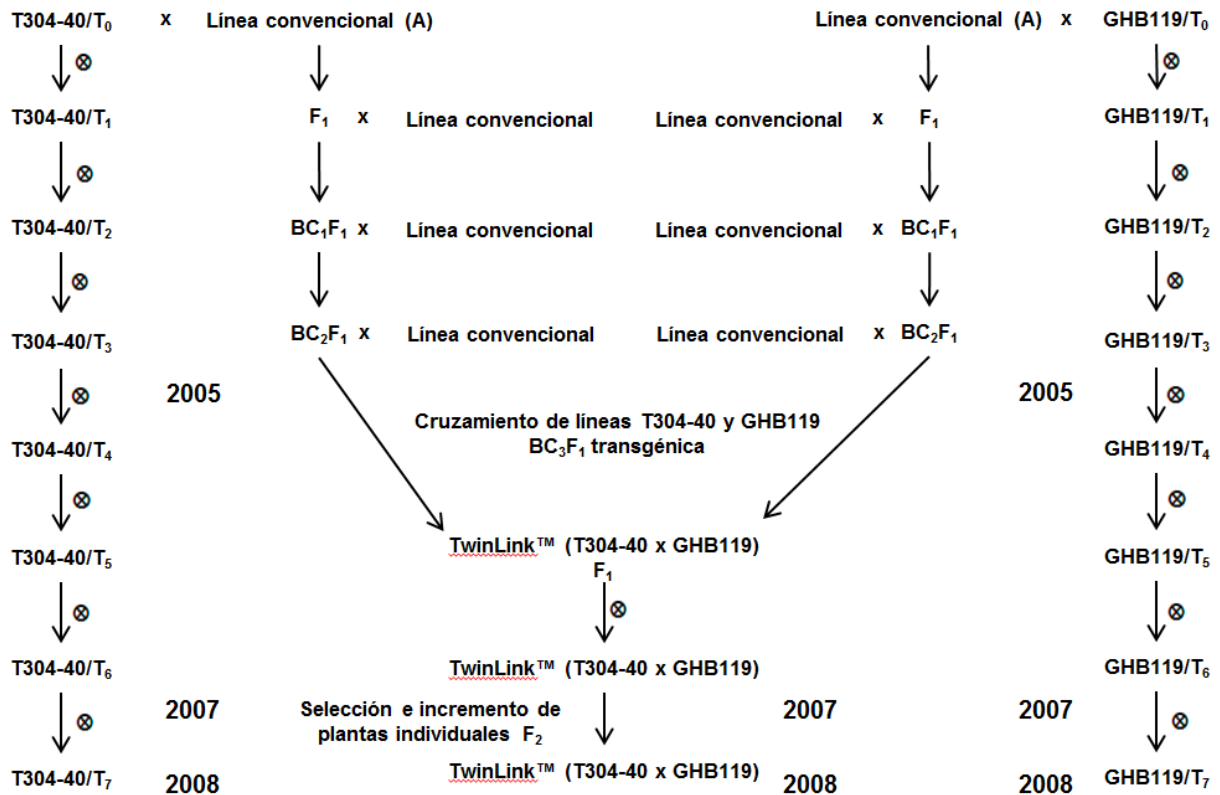
Cuadro 7. Análisis de segregación del algodón T304-40 x GHB119.

| Parentales de la F ₁ y cigocidad para los eventos T304-40 y GHB119 | Generación | Proporción | Observada ^a | Esperada | χ^2 calculada |
|---|----------------|------------|---|-------------|--------------------|
| | | | WT/WT: T304-40/WT: GHB119/WT: T304-40/GHB119 | | |
| Plantas hemicigotas T304-40 (<i>cry1Ab/bar</i>) cruzadas con plantas hemicigotas GHB119 (<i>cry2Ae/bar</i>) | F ₁ | 1:1:1:1 | 19:15:25:21 | 20:20:20:20 | 2.6 |

^a Probado para homocigosidad mediante PCR.

^b Asume un modelo de un *locus* para cada gen. 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 7.815 con tres grados de libertad.

Figura 7. Diagrama del desarrollo del algodón T304-40 x GHB119 (TwinLink®).



Notas:

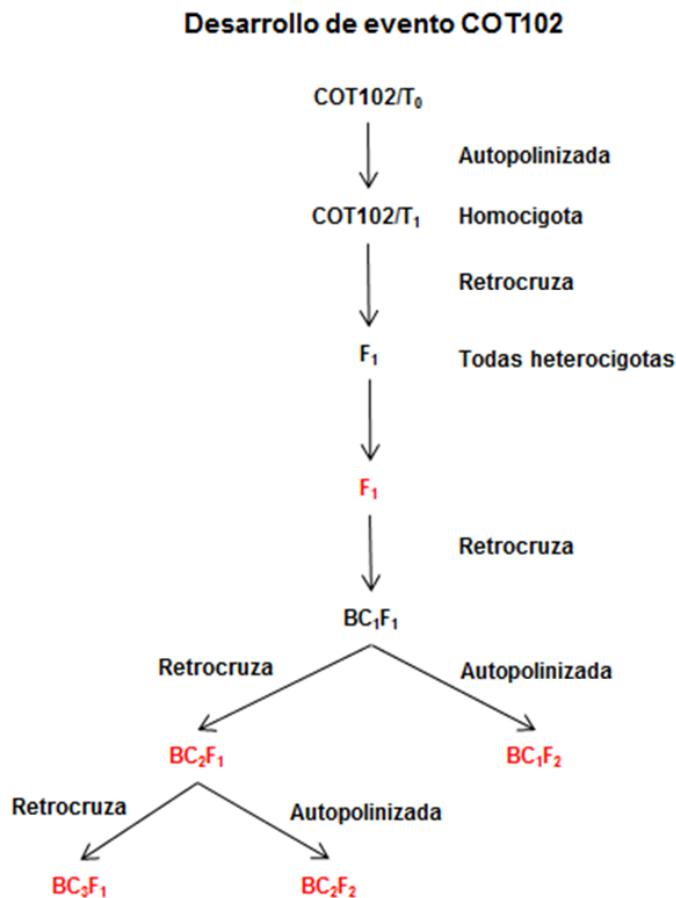
- En cada generación, las plantas de algodón fueron asperjadas con glufosinato de amonio para eliminar las que no expresaban el gen *bar*.
- ⊗ = autocruzamiento.
- Las plantas homocigóticas T₃ se identificaron plantando 25 semillas y asperjándolas con glufosinato de amonio para identificar los lotes de semillas segregantes. También se realizó el análisis de homocigosidad 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*).

2.5. Evento COT102.

La estabilidad del evento COT102 fue analizada utilizando plantas de cinco generaciones. Se analizaron plantas individuales de las generaciones F₁, BC₁F₂, BC₂F₁, BC₂F₂ y BC₃F₁ (Figura 8) para determinar la expresión de la proteína Vip3Aa19 (VIP3/VIP3A) mediante en ensayo cualitativo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) (Cuadro 8).

Todas las generaciones segregaron como se esperaba para un sitio de inserción único. La progenie F₁ fue producida a partir de una población homocigota y, como se esperaba, todas las plantas expresaron la proteína Vip3Aa19. Las otras cuatro generaciones evaluadas produjeron los resultados esperados con relación a la expresión de la proteína Vip3Aa19. El valor crítico de Ji cuadrada para rechazar la hipótesis nula fue de 3.84 (p=0.05) con un grado de libertad (Strickberger, 1976)²⁰. Un valor menor a 3.84 indica que la herencia del gen *vip3Aa19* se comporta siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante. El sitio de inserción permanece estable a través de múltiples generaciones de autopolinización y retrocruzas (Artim *et al.*, 2003).

Figura 8. Mapa de las generaciones del evento COT102 utilizadas para estudios de estabilidad genética.



Cuadro 8. Datos de segregación de la progenie del evento COT102.

| Generación | Valores esperados | | Valores esperados ¹ | | χ ² |
|--------------------------------------|-------------------|-----------|--------------------------------|-----------|---------------------|
| | Positivos | Negativos | Positivos | Negativos | |
| F ₁ (1:0) | 122 | 0 | 122 | 0 | |
| BC ₁ F ₂ (3:1) | 82.5 | 27.5 | 85 | 25 | 0.1939 ² |
| BC ₂ F ₁ (1:1) | 54.5 | 54.5 | 47 | 62 | 1.7982 ² |
| BC ₂ F ₂ (3:1) | 36 | 12 | 33 | 15 | 0.5277 ² |
| BC ₃ F ₁ (1:1) | 24 | 24 | 26 | 22 | 0.1875 ² |

¹ Basado en los resultados de la prueba cualitativa ELISA.

² No significativo (p=0.05).

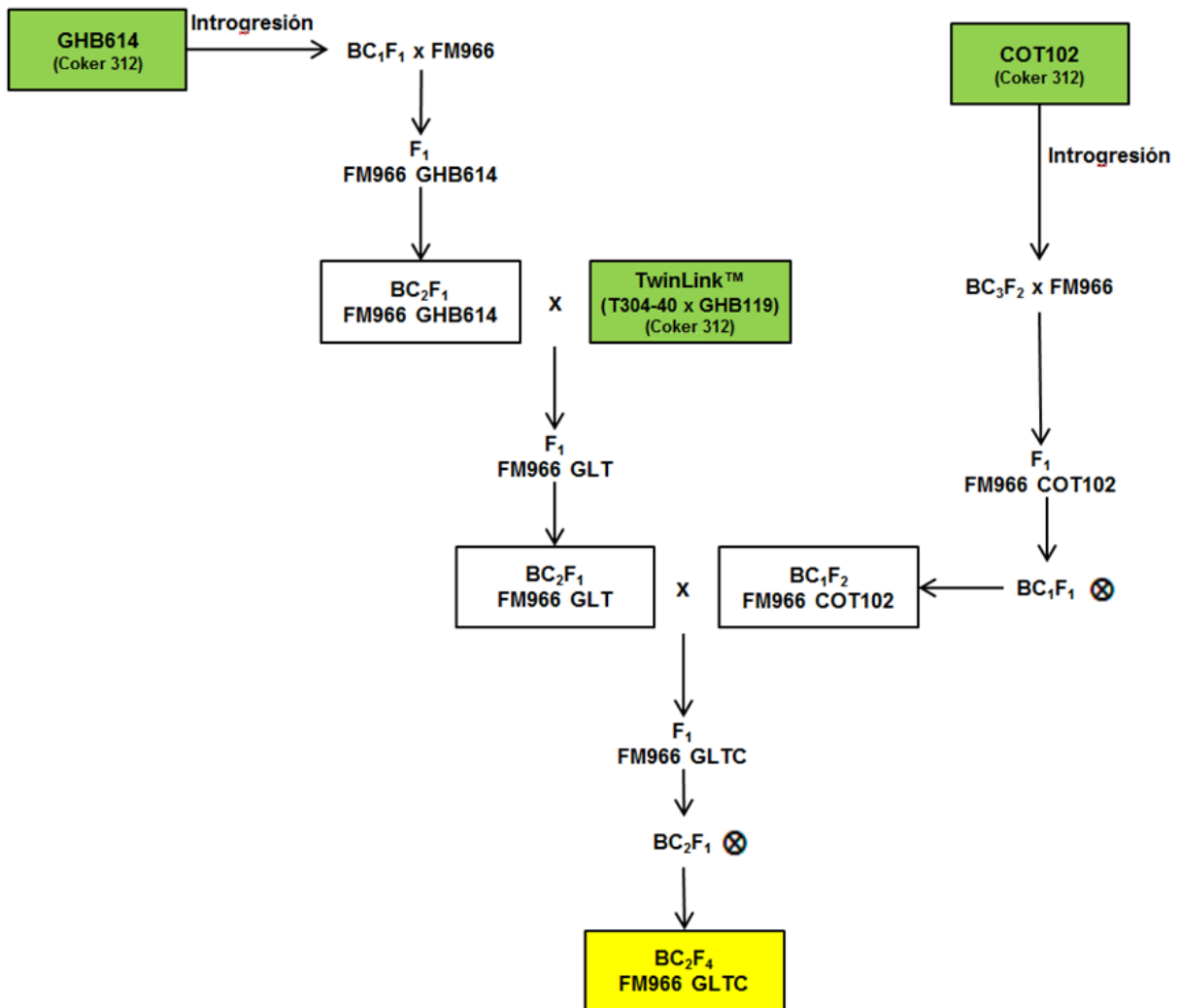
²⁰ Los valores mayores al valor crítico se presentarían una vez en veinte oportunidades si la hipótesis es correcta.

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

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

El algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614, T304-40 x GHB119 y COT102 como se ilustra en la [Figura 9](#). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

Figura 9. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102.



3. Expresión de proteínas y su localización.

Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 fueron determinados mediante la técnica de ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzima (ELISA) y analizados estadísticamente en raíz, hoja, cuadros, bellotas, polen y semilla de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V6, inicio de cuadros, floración y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos (Georgia, Arkansas y Texas), durante el ciclo 2013. Los resultados indican que los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 son similares entre el evento apilado GLTP y los correspondientes eventos parentales.

k) Descripción del método de transformación.

1. Evento GHB614.

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

El sistema de transformación con *A. tumefaciens* ha sido ampliamente estudiado y se ha empleado como herramienta biotecnológica rutinaria para el desarrollo de plantas transgénicas durante muchos años. *A. tumefaciens* es una bacteria fitopatógena que habita de manera natural en el suelo, la cual utiliza un proceso de ingeniería genética natural para alterar la maquinaria metabólica de las células de la planta hospedante (Tempé *et al.*, 1977; Chilton *et al.*, 1977). Esta bacteria, además de su cromosoma circular, posee un plásmido de aproximadamente 200 kilobases denominado plásmido Ti (del inglés *tumor-inducing*). Este plásmido contiene una secuencia bien definida de DNA de aproximadamente 35 kilobases y delimitada hacia ambos extremos por una franja repetida de 25 pares de bases, llamada T-DNA (del inglés *Transferred DNA*, DNA transferido). Asimismo, en otra parte del plásmido, fuera de la región del T-DNA, se halla la región *vir* que interviene en la transducción de señales en la bacteria y en la regulación del proceso de transferencia del T-DNA (Zambryski, 1988). La comprensión de este proceso natural de transformación y el hecho de que cualquier DNA externo colocado entre los bordes del T-DNA puede ser transferido e integrado de manera estable dentro del cromosoma de las células vegetales, ha permitido la construcción de vectores para la transformación genética de varias especies de plantas (Deblaere *et al.*, 1985; Hooykaas & Shilperoort, 1992).

Los *explantos* derivados del algodón Coker 312 fueron expuestos a un cultivo de *A. 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 cloranfenicol para eliminar las bacterias remanentes (FSANZ, 2008²¹). 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 con base en su tolerancia al glifosato. La progenie fue autopolinizada y las plantas homocigotas fueron retrocruzadas con el parental recurrente para obtener material homocigótico para análisis posteriores (verificación del inserto por *Southern blot* o PCR), o cruzadas

²¹ Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). 2008. Final assessment report. Application A614. Food derived from glyphosate-tolerant cotton line GHB614.

con germoplasma élite en programas de mejoramiento genético para desarrollar nuevas variedades de algodón tolerantes a glifosato (sección j.2).

2. Evento T304-40.

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

Los explantes de cotiledones de plántulas germinadas *in vitro* derivadas de la variedad Coker 315, fueron co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA 101 que contenía un sistema de vectores binario (Deblaere *et al.*, 1987). Después del co-cultivo, los tejidos de algodón fueron cultivados en un medio selectivo con glufosinato de amonio. Al medio se le adicionó claforan para eliminar los residuos de *A. tumefaciens*. Una vez formado, el callo fue transferido a un medio de regeneración con glufosinato de amonio para desarrollo y selección de embriones somáticos. Las plántulas obtenidas (T_0) se transfirieron a invernadero y una vez que se comprobó su tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, se cultivaron para la producción de semillas. Las plantas de la generación T_0 fueron autopolinizadas y seleccionadas mediante la aspersión de glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros durante siete generaciones (T_7). Asimismo, las plantas T_0 fueron cruzadas con algodón convencional para obtener líneas homocigóticas estables (BC_3F_3), las cuales se cruzaron con el evento GHB119 para desarrollar el algodón TwinLink® (sección j.2).

3. Evento GHB119.

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

Los callos embriogénicos derivados de explantes de hipocótilos del algodón Coker 312 germinados *in vitro* fueron co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1^R que contenía el vector pTEM12. Después del co-cultivo, los tejidos de algodón fueron cultivados en un medio selectivo con glufosinato de amonio. Al medio se le adicionó claforan (250 o 125 mg/L) para eliminar los residuos de *A. tumefaciens*. Una vez formado, el callo fue transferido a un medio de regeneración con glufosinato de amonio para desarrollo y selección de embriones somáticos. Las plántulas obtenidas (T_0) se transfirieron a invernadero y una vez que se comprobó su tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, se cultivaron para la producción de semillas. Las plantas de la generación T_0 fueron autopolinizadas y seleccionadas mediante la aspersión de glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros durante siete generaciones (T_7). Asimismo, las plantas T_0 fueron cruzadas con algodón convencional para obtener líneas homocigóticas estables (BC_3F_3), las cuales se cruzaron con el evento T304-40 para desarrollar el algodón TwinLink® (sección j.2).

4. Evento COT102.

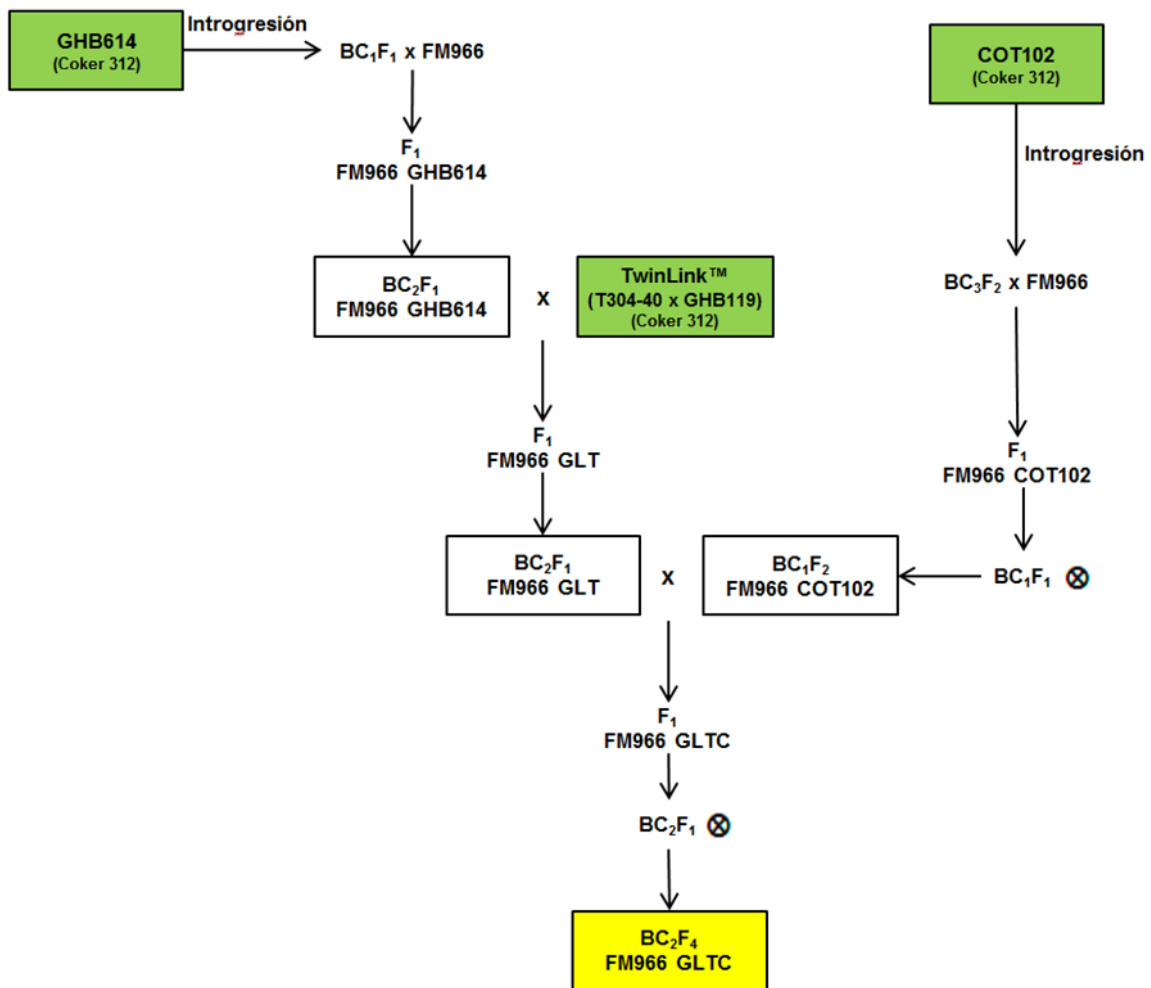
El evento de transformación COT102 se obtuvo mediante transformación por *Agrobacterium* de plantas de la variedad Coker 312. La transformación se realizó incubando células de *Agrobacterium*, conteniendo el vector de transformación pCOT1, con tejido de hipocótilo de algodón y subsecuente cultivo en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

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

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

El algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102 fue obtenido mediante técnicas de mejoramiento convencional a partir de los eventos parentales GHB614, T304-40 x GHB119 y COT102 como se ilustra en la [Figura 10](#). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional. Toda la información que describe la modificación genética se refiere a los eventos parentales individuales.

Figura 10. Esquema del proceso de cruzamiento convencional para la obtención del algodón GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102.



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.

1. Cuádruple apilado (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102).

El algodón GLTP fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614, T304-40 x GHB119 de Bayer y el evento COT102 de Syngenta (bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta).

Los resultados de los estudios *Southern blot*, bio-informáticos y PCR realizados en los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 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, T304-40, GHB119 y COT102, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GLTP. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GLTP. 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 GLTP contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

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::2*mepsps*::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. 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 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 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.

- *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 el Cuadro 9 se presentan los resultados esperados y obtenidos del análisis de hibridación.

Cuadro 9. Resumen de los resultados de hibridación que demuestran la ausencia de secuencias del esqueleto de vector en el algodón GHB614.

| Sonda | Posición en el vector | GHB614/ <i>EcoRV</i> | GHB614/ <i>NotI</i> | Coker 312/ <i>NotI</i> | Coker 312 + 1 copia de pTEM2 |
|-------|-----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| PT001 | 3992 → 6050 | -- | -- | -- | 9100 bp |
| PT002 | 5551 → 7589 | -- | -- | -- | 1250, 1550, 9100, bp |
| PT003 | 7044 → 9031 | -- | -- | -- | 1250; 1550 bp |
| PT004 | 8531 → 10575 | -- | -- | -- | 1550, 9100 bp |
| PT005 | 10068 → 11928 | -- | -- | -- | 9100 bp |

| | | | | | |
|-------|----------|---------------|-----------|----|---------|
| PT006 | 1 → 4032 | 4800, 9000 bp | >14000 bp | -- | 9100 bp |
|-------|----------|---------------|-----------|----|---------|

--=" sin hibridación

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).

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.

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.

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.

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.

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.

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 (*G. 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*).

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

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).

3. Evento T304-40.

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

El DNA genómico aislado del algodón T304-40 y de la variedad convencional FiberMax® 966 fue sometido a análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (promotor *5'e1-Ps7s7ter*, gen *cry1Ab*, terminador *3'me1*, promotor *P35S3*, gen *bar*, terminador *3'nos*), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas. Los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con seis sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética, o la sonda del T-DNA completo. Los resultados de este análisis demostraron que únicamente una copia casi completa del T-DNA, flanqueada por una copia incompleta invertida del *cassette* del gen *cry1Ab* y un terminador *3'me1* adicional, fueron transferidos al algodón T304-40. 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 estructural del evento T304-40, se prepararon muestras de DNA genómico a partir de plantas individuales de cuatro cultivares diferentes, de cuatro generaciones y cultivadas bajo condiciones ambientales diferentes en tres localidades. El DNA aislado fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el fragmento de DNA integrado. Analizando el DNA del evento T304-40 digerido con la enzima *EcoRV* con la sonda del gen *cry1Ab*, se demostró la presencia de los tres fragmentos esperados en todas las muestras

analizadas. Dos de estos fragmentos representan la unión entre las secuencias transgénicas y el DNA de la planta de algodón y el tercero representa un fragmento interno. Los resultados obtenidos demostraron la estabilidad genética del evento T304-40 a través diferentes generaciones, diferentes variedades y cultivadas en ambientes diferentes. Adicionalmente, los datos de segregación también confirmaron la estabilidad del inserto y demostraron que éste segrega como un *locus* mendeliano dominante.

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

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

3.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.

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

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

3.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.

Fragmento de integración de los bordes derecho e izquierdo.

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

La secuencia del *locus* de pre-integración, así como las secuencias flanco 5' y 3' fue determinada mediante análisis PCR, utilizando DNA genómico del algodón convencional como plantilla y un par de *primers* específicos para las secuencias flanco 5' y 3', lo cual permitió determinar 837 bp correspondientes al *locus* de pre-integración, incluyendo 480 bp de la secuencia flanco 5', 325 bp de la secuencia flanco 3' y un sitio de delección de 32 bp. Este sitio de delección detectado entre las secuencias 5' y 3' del *locus* de pre-integración, no está presente en el *locus* transgénico del evento T304-40 debido a que fue eliminado durante el proceso de transformación (Moens & De Pestel, 2008²²).

²² Moens, S.; De Pestel, K. 2008. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40. Bayer BioScience N.V. Belgium. BBS08-002.

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

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

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

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

Para predecir la presencia potencial de nuevas secuencias codificantes en las regiones de unión 5' y 3', se utilizaron herramientas de búsqueda de genes y marcos de lectura abiertos (ORF). No se detectaron ORF en ninguno de los sitios de unión, se detectó un promotor putativo en la secuencia flanqueante 5', sin embargo, como no se encontraron genes adicionales en dirección hacia abajo, es muy probable que este promotor no tenga ninguna función biológica.

4. Evento GHB119.

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

El DNA genómico aislado del algodón GHB119 y de la variedad convencional FiberMax® 966 fue sometido a análisis *Southern blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación (terminador 3'nos, gen *bar*, promotor PCsVMV, promotor P35S2-5'cab22L, gen más péptido de tránsito TPssuAt-*cry2Ae*, terminador más borde derecho 3'35S-RB), así como el fragmento completo del T-DNA, como sondas. Los fragmentos de DNA resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana y secuencialmente hibridados con seis sondas diferentes, cada una representando un fragmento del *cassette* de transformación genética, o la sonda del T-DNA completo. Los resultados de este análisis demuestran que únicamente una copia completa del T-DNA fue integrada en el algodón GHB119 y que el DNA transferido al algodón corresponde a la misma configuración diseñada en el vector de transformación (Scott *et al.*, 2008²³).

²³ Scott, A.; Bushey, D.; Freyssinet, M.; Poe, M.; Rinehardt, M. 2008. Petition for Determination of Nonregulated Status for Insect-Resistant and Glufosinate Ammonium-Tolerant cotton: TwinLink™ cotton (events T304-40 x GHB119) OECD Unique Identifier BCS-GHØ4-7 x BCS-GHØ5-8. Bayer CropScience LP. Research Triangle Park, NC, USA.

4.2. Estabilidad de la secuencia de DNA insertada.

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

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

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

4.4. Ausencia de secuencias remanentes del vector.

El algodón GHB119 no contiene secuencias del esqueleto del vector pTEM12, lo cual fue demostrado mediante análisis *Southern blot*, para este análisis el DNA genómico aislado de plantas de algodón GHB119 fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRV* o *DraI* y se utilizaron cinco sondas que cubren la secuencia completa del esqueleto del vector pTEM12. El control positivo fue evaluado con la sonda completa del T-DNA (PT026-2).

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

4.5. Regiones flanqueantes de las secuencias insertadas.

Fragmento de integración de los bordes derecho e izquierdo.

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

Adicionalmente, se realizaron análisis PCR utilizando DNA genómico del algodón convencional como plantilla y un par de *primers* específicos para las secuencias flanqueantes 5' y 3', lo cual permitió determinar 684 bp correspondientes al *locus* de pre-integración, incluyendo 367 bp de la secuencia flanqueante 5', 309 bp de la secuencia flanqueante 3' y un sitio de delección de 8 bp. El análisis bioinformático del *locus* de pre-inserción, demostró que el origen de las secuencias flanqueantes caracterizadas es la planta de algodón.

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

Para identificar la presencia de genes funcionales conocidos en el *locus* de pre-inserción del evento GHB119, se realizó un análisis de búsqueda de similitud de secuencias BLASTx²⁴, pero no se detectó ninguna proteína conocida.

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

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

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

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

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

5. Evento COT102.

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

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

El número de copias del T-DNA del plásmido pCOT1 insertadas en el genoma del algodón, la integridad de las secuencias codificantes *vip3Aa19* y *aph4*, la integridad de los *cassettes* de expresión de *vip3Aa19* y *aph4*, así como la confirmación de la ausencia de secuencias del esqueleto

²⁴ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias, ya sea de ADN, ARN o de proteínas.

del plásmido en el algodón fueron determinados mediante análisis *Southern Blot*, utilizando los diferentes componentes del *cassette* de transformación como sondas. Los resultados del análisis indican que ninguna de las sondas específicas para regiones fuera del T-DNA hibridaron con el DNA genómico del algodón COT102, lo que confirma la ausencia de cualquier otra secuencia de DNA fuera de los bordes del T-DNA (Artim *et al.*, 2003²⁵).

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

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.

2. Proteína Cry1Ab.

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

3. Proteína Cry2Ae.

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

4. Proteína PAT/*bar*.

Tanto el algodón T304-40 como el algodón GHB119 expresan la proteína fosfotransferasa acetil (PAT/*bar*) de 183 aminoácidos, codificada por el gen *bar* de 552 pb derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, utilizado como marcador de selección y que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

²⁵ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.

5. Proteína Vip3Aa19.

El evento COT102 produce la proteína insecticida Vip3Aa19 de 789 aminoácidos codificada por el gen *vip3Aa19* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, esta proteína confiere resistencia al ataque de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), y gusano soldado (*Spodoptera exigua*).

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

6. Proteína APH4.

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

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

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

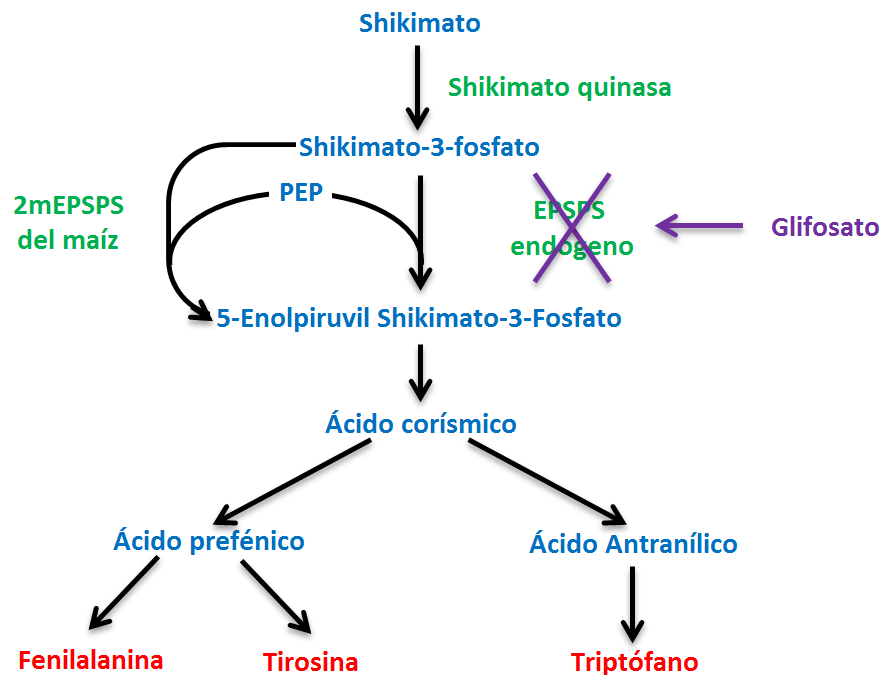
1. Proteína 2mEPSPS.

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 el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína 2mEPSPS (De Beuckeleer, 2003), la cual está constituida por 445 aminoácidos y tiene un peso molecular de ~47.5 kDa. La expresión de la proteína 2mEPSPS confiere tolerancia al herbicida glifosato en las plantas de algodón.

El mecanismo de acción del glifosato consiste en la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvilshikimate-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 (Steinrücken & Amrhein, 1980). La enzima EPSPS cataliza la transferencia reversible del grupo enolpiruvil desde el fosfoenol piruvato (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 shikimato y, por lo tanto, las proteínas EPSPS no están presentes en mamíferos, peces, aves, reptiles e insectos, lo cual contribuye con la baja toxicidad del herbicida glifosato para estos organismos (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 11).

Figura 11. Representación esquemática del mecanismo de acción del glifosato y el mecanismo de tolerancia mediado por 2mEPSPS.



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

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

Desde la década de 1980 se han realizado varios intentos para identificar y caracterizar enzimas EPSPS insensibles a glifosato a partir de varios organismos, con el objetivo de obtener plantas genéticamente modificadas tolerantes a este herbicida (Kishore and Shah, 1988). Lebrun *et al.* (1997) seleccionaron un gen con doble mutación a partir del maíz, el cual unido a un péptido de tránsito quimérico optimizado ha permitido obtener una óptima tolerancia a glifosato en varios cultivos, sin efecto pleiotropicos: el gen *2mepsps* codificando la proteína 2mEPSPS. El gen *2mepsps* ha sido introducido como fuente de tolerancia a glifosato en maíz evento GA21, el cual ha sido aprobado por diferentes agencias para liberación al ambiente y consumo alrededor del mundo. Otro cultivo en el cual se ha logrado la tolerancia a glifosato a partir de mutagénesis del gen *epsps* es el arroz (Zhou *et al.*, 2006).

2. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

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

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

2.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.

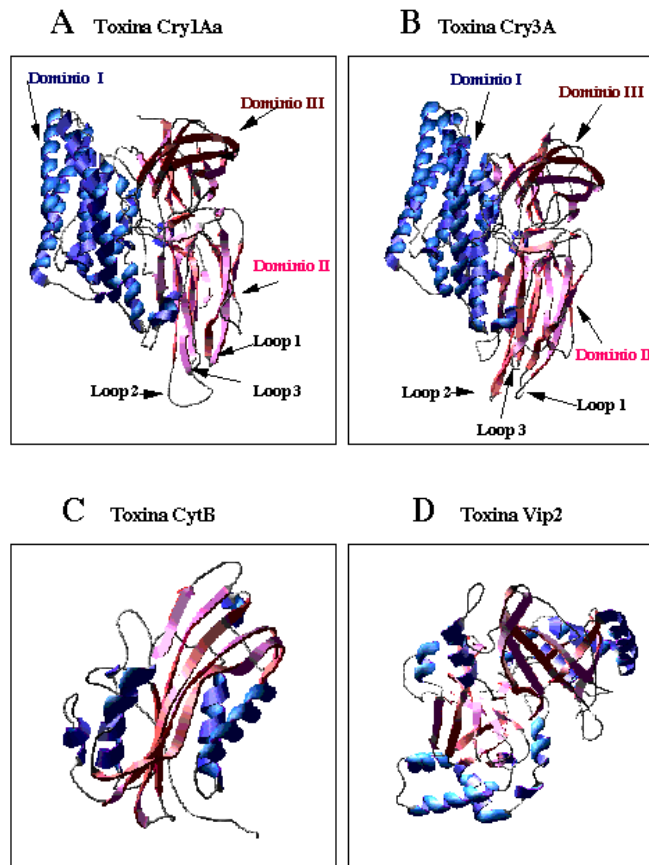
Los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino liberando a la pro-toxina (Gringorten *et al.*, 1992), también se requiere un medio ambiente reductor para romper los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad del extremo C-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa. El intestino medio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

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

La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry (Grochulski *et al.*, 1995), ha revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios. El dominio I está constituido por un ramillete de siete α -hélices anfipáticas donde seis de ellas rodean a la α -hélice 5. El dominio II está formado por tres láminas β -antiparalelas que terminan en asas (*loops* 1, 2 y 3) en el vértice de la molécula formando un prisma. El dominio III está compuesto de dos hojas β -plegadas arregladas en forma de emparedado una sobre otra (Figura 12).

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

Figura 12. Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis*.



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

2.2. Unión al receptor.

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

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

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

2.3. Inserción en la membrana y formación de poro.

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

2.4. Citólisis.

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

2.5. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

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

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

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

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

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

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

3. Proteína PAT/*bar*.

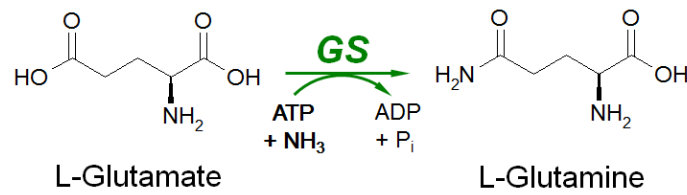
El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 contiene el cassette de expresión *bar* que, cuando se transcribe, origina la proteína PAT de ~21 kDa que consiste de un polipéptido de 183 aminoácidos (Thompson *et al.*, 1987). La secuencia del gen *bar* proviene de *Streptomyces hygroscopicus* y codifica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

El herbicida glufosinato es una mezcla racémica de formas D y L de fosfotricina, aunque sólo la forma L (L-fosfotricina) tiene actividad herbicida. Este herbicida es un potente inhibidor de la enzima glutamino sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une competitivamente a la enzima GS desplazando al L-glutamato del sitio activo (OECD, 1999; OECD, 2002a) (Figura 13).

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, aún siendo un nutriente vegetal es tóxico si se encuentra en exceso y lleva a la muerte de la célula vegetal (OECD, 1999; OECD, 2002a).

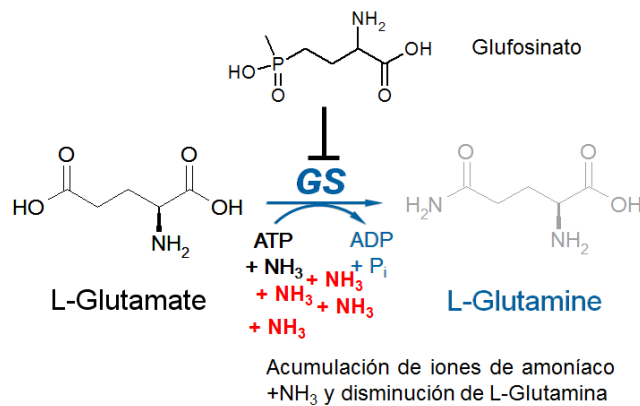
Figura 13. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.

a) Asimilación del amoníaco.



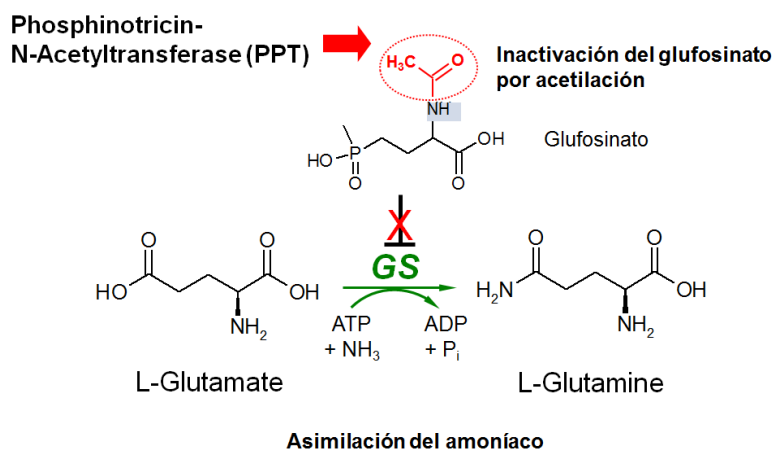
GS: Glutamine synthase

b) Inhibición de la enzima GS.



La enzima PAT es una acetiltransferasa que cataliza específicamente la acetilación de L-fosfinotricin (L-PPT) y demetilfosfinotricin (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 tóxicos de amoníaco y en 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 14. 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 de Michaelis-Menten (Wehrmann et al., 1996). En presencia de acetyl-CoA como cosustrato, la proteína PAT cataliza la acetilación del grupo amino libre de L-Fosfinitricin (L-PPT) a N-acetil glufosinato (N-acetyl-L-PPT), un compuesto que no inactiva la glutamina sintetasa y no tiene actividad herbicida.

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

4. Proteína Vip3Aa19.

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

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

El sitio de unión de Vip3Aa19 en el intestino se correlaciona con la toxicidad y es diferente al sitio en donde se une Cry1A (Lee et al., 2003; Sena et al., 2009; Abdelkefi-Mesrati et al., 2009). Los síntomas de toxicidad de Vip3Aa se desarrollan con más lentitud que con Cry1A (de 48 a 72 horas, en comparación con 16 a 24 horas), pero se puede comparar la toxicidad de Vip3Aa con la de Cry1 por unidad de peso (Yu et al. 1997; Ali & Luttrell, 2011).

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

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

5. Proteína APH4.

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

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

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

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

1. Subproductos de degradación de las proteínas.

Con excepción de las proteínas 2mEPSPS (GHB614) y Cry2Ae (GHB119) que están fusionadas a péptidos de tránsito para dirigir dichas proteínas al cloroplasto, no se esperan subproductos de

degradación adicionales en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102, ya que cualquier degradación adicional de las proteínas expresadas resultaría en un polipéptido inactivo.

2. 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-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) pero que no altera su función metabólica en la ruta del shikimato (Hammond *et al.*, 2013). Para restaurar el sitio de escisión del péptido de tránsito se adicionó el aminoácido metionina en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína 2mEPSPS (De Beuckeleer, 2003), la cual está constituida por 445 aminoácidos y tiene un peso molecular de ~47.5 kDa. La expresión de la proteína 2mEPSPS confiere tolerancia al herbicida glifosato en las plantas de algodón.

Las propiedades bioquímicas de la enzima 2mEPSPS han sido bien caracterizadas en comparación con las proteínas EPSPS silvestres y, con excepción de su insensibilidad al glifosato, el cambio en dos aminoácidos no ha modificado sus propiedades bioquímicas. Los efectos metabólicos derivados de la actividad de la proteína 2mEPSPS en plantas son comparables a los de las proteínas EPSPS endógenas, excepto por su insensibilidad al glifosato (Hammond *et al.*, 2013).

El extremo 5' de la region codificante del gen *2mepsps* en el inserto GHB614 está unido al péptido de tránsito TPotp C, el cual dirige la proteína 2mEPSPS al cloroplasto, sitio donde la proteína es funcionalmente activa. 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 de la proteína 2mEPSPS, el péptido de transferencia al cloroplasto se degrada rápidamente por proteasas endógenas de la planta (Bartlett *et al.*, 1982; Della-Cioppa *et al.*, 1986).

La proteína EPSPS es la sexta enzima en la ruta metabólica del shikimato para la biosíntesis de compuestos aromáticos presentes en microorganismos y plantas (Tzin & Galili, 2010). Estas enzimas son ubicuas en la naturaleza y están presentes en alimentos derivados de plantas y fuentes microbianas. La proteína 2mEPSPS presenta una alta identidad de secuencia de aminoácidos con la enzima EPSPS nativa del maíz (>99.5%), así como con otras proteínas EPSPS encontradas en cultivos con un largo historial de seguridad para el consumo humano como arroz, vid, lechuga, tomate y colza, o en hongos o fuentes microbianas como la levadura del pan (Rouquié, 2006). Por lo tanto, estas proteínas tienen un largo historial de uso seguro como componentes endógenos de alimentos y forrajes.

Cuadro 10. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS con otras proteínas EPSPS.

| | Maíz | Arroz | Vid | Lechuga | Tomate | Colza |
|----------------------------|-------|-------|-----|---------|--------|-------|
| Identidad de secuencia (%) | >99.5 | 86 | 79 | 77 | 75 | 75 |

3. Proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

El extremo 5' de la región codificante del gen *Cry2Ae* en el inserto GHB119 está unido al péptido de tránsito TPssuAt (péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa del gen *at1sA* de *Arabidopsis thaliana*), el cual dirige la proteína *Cry2Ae* al cloroplasto. El péptido de tránsito es desprendido de la proteína *Cry2Ae* durante la transferencia de la proteína a través de la membrana del cloroplasto y es degradado por proteasas endógenas de la planta.

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

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

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

La expresión de las proteínas *Cry1Ab* y *Cry2Ae* está regulada por promotores constitutivos (*Ps7s7* y *P35S2*) y se expresan en los tejidos de la planta de algodón GLTP durante todo el ciclo del cultivo. Como consecuencia de lo anterior, los residuos de plantas post-cosecha de este cultivo pueden contener pequeñas cantidades de las proteínas con actividad insecticida. Después de la cosecha, partes de las plantas tales como los tallos, restos de hoja y bellotas no cosechadas son incorporarlas al suelo a fin de promover su descomposición. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) llevó a cabo una evaluación ambiental de las proteínas *Cry1Ab* y *Cry2Ae*, no

encontrando impactos significativos (EPA, 2012²⁶). Se ha observado que los cristales de las proteínas *Bt* se degradan rápidamente en el campo debido al efecto de la radiación solar y de la temperatura (USDA, 1999).

Los organismos del suelo podrían estar expuestos a las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae a través del contacto con las raíces del algodón (alimentación directa), exudados de las raíces, incorporación de residuos de la planta en el suelo después de la cosecha, o por polen depositado en el suelo. Estudios para evaluar la presencia de las proteínas Cry en exudados de la raíz de algodón *Bt*, mediante ensayos inmunológicos y de eficacia, indicaron que no se detectó proteína Cry en suelo o solución hidropónica en donde se había cultivado algodón *Bt* (Saxena & Stotzky, 2001²⁷). La evidencia existente indica que las proteínas Cry no se acumulan en el suelo a niveles tóxicos para los artrópodos. Debido a que las proteínas Cry se derivan de una bacteria que es un habitante natural del suelo (*Bacillus thuringiensis*) y además se encuentra en insecticidas microbiales comerciales (De Maagd *et al.*, 2003²⁸), se espera que la degradación de las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae expresadas por los eventos T304-40 y GHB119, sea similar a la degradación de esas mismas proteínas producidas de manera natural por las bacterias del suelo.

Los estudios de degradación en suelo bajo condiciones aeróbicas se realizaron en suelo con diferentes texturas provenientes de tres localidades donde se ha cultivado algodón *Bt* (Proctor, AR: franco arcilloso; Senatobia, MS: franco limoso; East Bernard, TX: franco arcillo arenoso). Para determinar la DT₅₀ (tiempo para que se disipe el 50% de la concentración inicial del material bioactivo) se utilizó uno de los insectos blanco más susceptibles a las proteínas Cry (*Heliothis virescens*). Los suelos fueron tratados de forma separada con 15 µg/g de proteína Cry1Ab y 50 µg/g de proteína Cry2Ae y se tomaron muestras regularmente durante un periodo de 45 días. Para los bioensayos las larvas de *H. virescens* fueron expuestas a muestras de suelo incorporadas en la dieta. Simultáneamente, se realizó un estudio de dosis-respuesta durante seis días con larvas de *H. virescens* expuestas a dosis de 0.004 a 0.28 µg/g para la proteína Cry1Ab y de 0.056 a 3.4 µg/g para la proteína Cry2Ae, para obtener la curva estándar dosis-respuesta y determinar la degradación de las proteínas a través del tiempo con base en el bioensayo. La DT₅₀ se determinó a partir de la curva de regresión exponencial de primer orden y se obtuvieron valores promedio para los tres tipos de suelo de 3.6 días para Cry1Ab y 3.4 días para Cry2Ae. Adicionalmente, las muestras de suelo fueron analizadas mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para determinar el contenido de proteínas Cry y los resultados mostraron la continua degradación de las proteínas en el suelo durante el estudio.

4. Proteína PAT/*bar*.

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

²⁶ US EPA. 2012. Biopesticides registration action document. Plant-incorporated protectants: *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein and the Genetic Material Necessary for its Production in Event T304-40 Cotton [PC Code 006525, OECD Unique Identifier: BCS-GHØØ4-7]; *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae protein and the Genetic Material Necessary for its Production in Event GHB119 Cotton [PC Code 006600, OECD Unique Identifier: BCS-GHØØ5-8]; and TwinLink™ Cotton (T304-40 and GHB119 Combination PIP product) [OECD Unique Identifier: BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8]. U.S. Environmental Protection Agency.

²⁷ Saxena, D. and Stotzky, G. 2001. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin released from root exudates and biomass of *Bt* corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1225–1230.

²⁸ De Maagd, R.A.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, N.; Schnepf, H.E. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 37:409–433.

hygroscopicus y codifica la proteína fosfinotricina-N-acetil transferasa (PAT) (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confiere tolerancia a glufosinato de amonio.

La enzima PAT es una acetiltransferasa que cataliza específicamente la acetilación de L-fosfinotricin (L-PPT) y demetilfosfinotricin (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 tóxicos de amoníaco y en 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. La proteína PAT/*bar* acetila el grupo amino libre de L-PPT para producir N-acetil glufosinato sin actividad herbicida. El glufosinato acetilado no es capaz de unirse a la glutamino sintetasa y, por lo tanto, no interrumpe la fotorespiración y evita la acumulación de amoníaco.

La proteína PAT/*bar* tiene gran especificidad de sustrato por la L-PPT, el componente herbicida del glufosinato de amonio, y es poco probable que afecte el sistema metabólico del algodón GLTP. Se han evaluado muchos productos con tolerancia al glufosinato incluyendo algodón, maíz, soya, canola, remolacha y arroz sin identificar factores que causen alguna preocupación de seguridad (www.isaaa.org).

5. Proteína Vip3Aa19.

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

El sitio de unión de Vip3Aa19 en el intestino se correlaciona con la toxicidad y es diferente al sitio en donde se une Cry1A (Lee *et al.*, 2003; Sena *et al.*, 2009; Abdelkefi-Mesrati *et al.*, 2009). Los síntomas de toxicidad de Vip3Aa se desarrollan con más lentitud que con Cry1A (de 48 a 72 horas, en comparación con 16 a 24 horas), pero se puede comparar la toxicidad de Vip3Aa con la de Cry1 por unidad de peso (Yu *et al.* 1997; Ali & Luttrell, 2011).

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

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

6. Proteína APH4.

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

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

Cada gen transferido al algodón requiere de secuencias reguladoras que permitan su transcripción en RNA y su posterior traducción en forma óptima. Las secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes introducidos en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 se presentan en el Cuadro 11. Aunque algunas secuencias reguladoras se derivan de patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV), virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV), estas secuencias no tienen capacidad de inducir enfermedades en el algodón.

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

Cuadro 11. Elementos genéticos transferidos al algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

| Gen/ Origen | Promotor | Elementos adicionales | Señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación 3' |
|-----------------------------------|--|--|---|
| GHB614 | | | |
| 2mepsps <i>Zea mays</i> | Ph4a748At Promotor del gen <i>H4</i> de la histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté <i>et al.</i> , 1987) que controla la expresión del gen <i>2mepsps</i> . El promotor Ph4a748, combinado con el <i>intron</i> del gen II de la histona variante H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet <i>et al.</i> , 1992) dirige | intron1 h3At <i>Intron</i> del gen II de la histona variante H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet <i>et al.</i> , 1992). TPotp C Péptido de tránsito optimizado que dirige la translocación de la proteína madura a los | 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) |

| Gen/ Origen | Promotor | Elementos adicionales | Señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación 3' |
|--|---|---|--|
| | un alto nivel de expresión constitutiva, especialmente en tejidos vegetales en rápido crecimiento. | 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). | |
| T304-40 | | | |
| cry1Ab <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> | 5'e1-Ps7s7 Promotor derivado del segmento 7 del genoma del virus de la atrofia del trébol subterráneo (SCSV) con la región promotora duplicada (Boevink <i>et al.</i> , 1995). El promotor Ps7s7 está fusionado a la secuencia líder 5' de la secuencia no traducida del gen <i>GE1</i> específico del tapetum del arroz. | - | 3'me1 Secuencia que contiene la región 3' no traducida del gen de la enzima 1 málico NADP derivado de <i>Flaveria bidentis</i> (Marshall <i>et al.</i> , 1996) |
| bar <i>Streptomyces hygroscopicus</i> | P35S3 Secuencia que incluye la región promotora del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985). El promotor 35S dirige una alta expresión constitutiva y es ampliamente usado como promotor para la alta expresión de genes. | - | 3'nos Secuencia que contiene la región no traducida del gen de la nopalina sintasa del T-DNA del plásmido pTiT37 (Depicker <i>et al.</i> , 1982) |
| GHB119 | | | |
| cry2Ae <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i> | P35S3 Secuencia que incluye la región promotora del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985). El promotor 35S dirige una alta expresión constitutiva y es ampliamente usado como promotor para la alta expresión de genes. | TPssuAt Secuencia que codifica el péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa del gen <i>at1sA</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (De Almeida <i>et al.</i> , 1989). Esta secuencia regula un significativamente alto y estable nivel de la proteína codificada en las hojas. El péptido de tránsito se encuentra unido a la secuencia líder no traducida de la proteína de unión a la clorofila a/b de <i>Petunia hybrida</i> . | 3'35s Secuencia que incluye la región 3' no traducida del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon <i>et al.</i> , 1991) |
| bar <i>Streptomyces hygroscopicus</i> | Pcsmv XYZ Secuencia que contiene la región promotora del virus del mosaico de la nervadura de la cassava (CsVMV) (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996). El promotor XYZ del CsVMV es activo en todos | - | 3'nos secuencia que contiene la región no traducida del gen de la nopaline sintasa del T-DNA del plásmido pTiT37 (Depicker <i>et al.</i> , 1982) |

| Gen/ Origen | Promotor | Elementos adicionales | Señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación 3' |
|---|--|-----------------------|---|
| | los órganos de la planta y tipos de células, lo que sugiere un patrón de expresión constitutiva. | | |
| COT102 | | | |
| vip3Aa19 <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa AB88 | Act2 Promotor del gen actina-2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Confiere la expresión constitutiva del gen <i>vip3Aa19</i> (An <i>et al.</i> , 1996) | - | 3'nos Terminador del gen nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , esta secuencia termina la transcripción y proporciona un sitio de polyadenilación. Esta secuencia no codifica una proteína (Bevan <i>et al.</i> , 1983) |
| aph4 <i>Escherichia coli</i> | Ubq3int Promotor más el primer <i>intron</i> del gen <i>ubiquitina-e</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Confiere expresión constitutiva del gen <i>aph4</i> (Norries <i>et al.</i> , 1993) | - | 3'nos Terminador del gen nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , esta secuencia termina la transcripción y proporciona un sitio de polyadenilación. Esta secuencia no codifica una proteína (Bevan <i>et al.</i> , 1983) |

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

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

Gossypium hirsutum, comúnmente denominado como algodón mexicano o algodón de tierras altas, pertenece a la familia Malvaceae, a la tribu Gossypieae y al género *Gossypium* (Cronquist, A. 1981). El género *Gossypium* comprende 50 especies con un número cromosómico básico de 13 (Fryxel 1992; Percival, *et al.*, 1999), de las cuales 14 se distribuyen en México. Usualmente, sólo cuatro especies de este género son cultivadas y se les conoce con el término genérico de algodón.

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 anfidiplóide²⁹ (**AADD**, $2n=4x=52$) produjo híbridos fértiles cuando fue cruzado con especies tetraploides americanas.

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 sub-productos como alimento humano y animal. De todas formas, estas toxinas son removidas en la producción de aceite y linter, haciendo que sea adecuado para el consumo humano. Entre los alimentos que pueden derivar del aceite de semilla de algodón se encuentran los aceites para frituras, la mayonesa, los aderezos para ensaladas, las grasas y las margarinas. Asimismo, luego de su procesamiento, el linter puede ser usado en la preparación de productos alimenticios con alto contenido de fibra, en espesantes para helados y aderezos de ensaladas.

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

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

1.2. Semilla de algodón para alimentación animal³⁰.

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

²⁹ Anfidiplóide (alopoliploide): poliploide formado tras la unión de dos conjuntos de cromosomas distintos y su posterior duplicación.

³⁰ 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

1.3. Productos derivados de semilla de algodón.

1.3.1. Aceite de semilla de algodón.

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

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

El aceite de semilla de algodón para consumo humano, requiere de un segundo procesamiento, luego de la extracción por solvente, los niveles de 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. Pasta de semilla de algodón como alimento animal.

La pasta 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 utilizarse como harina, pasta, copos o pellet. La pasta de semilla de algodón contiene alrededor de 41% de proteína y se utiliza principalmente como concentrado proteico en la alimentación de ganado.

La mayoría de los granos y forraje de granja son deficientes en las proteínas necesarias para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de animales. La pasta 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 valor energético, la pasta de semilla de algodón posee valores más elevados de fósforo que cualquier otra proteína vegetal.

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

1.3.4. Semilla de algodón deslintada.

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

Como se puede observar en líneas anteriores, el algodón como sus productos derivados son ampliamente utilizados de manera segura en el área textil, pepelera, de alimentos, etc., puesto que no han sido detectados efectos tóxicos ni alérgicos.

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

Los organismos donadores de los genes *2mepsps*, *cry1Ab*, *cry2Ae*, *vip3Aa19*, *bar* y *aph4* son plantas utilizadas comúnmente como alimento humano o animal, o bien bacterias que habitan de manera natural en el suelo o en el intestino humano y que han sido utilizadas como fuentes de genes para

mejorar los atributos de varios cultivos en los últimos 20 años, sin que se hayan encontrado evidencias de efectos patogénicos, tóxicos o alergénicos para humanos y animales (www.isaaa.org; <https://bch.cbd.int/>).

Las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Streptomyces hygroscopicus* no son utilizadas como alimento humano ni como alimento o suplemento en nutricional animal. Ninguna de las bacterias utilizadas como donantes de genes tiene antecedentes de ser tóxicas para humanos o animales. De todas maneras, es importante considerar que para la obtención del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 no se utilizan bacterias completas sino solo uno de sus genes. Los estudios bioinformáticos 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 cápita* 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 se 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.

2.2. *Bacillus thuringiensis*.

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

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

Un gran número de subespecies de *B. thuringiensis* se han aislados de larvas muertas principalmente del orden coleóptera, díptera y lepidóptera, pero muchas de las subespecies se han

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

2.3. *Streptomyces hygroscopicus*.

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

2.4. *Escherichia coli*.

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

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

3. Organismos donadores de los elementos reguladores.

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

3.1. *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gram negativas, flageladas, peritricas; forma colonias mucoides y blancas.

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).

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, arrosetadas 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 (no demasiados y compactos), en el extremo de las ramas o el tallo, 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).

3.3. 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 cápita* 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 se 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.

3.4. Girasol (*Helianthus annuus*).

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

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

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

3.5. Arroz (*Oryza sativa*).

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

La planta del arroz tiene un tallo cilíndrico formado de nudos y entrenudos alternados con hojas seguidos de secciones sin ellas. Su altura va desde sesenta hasta 120 cm. Las hojas son largas y planas. En el punto donde la hoja se une al tallo, hay una lígula con una serie de cirros largos y sedosos. Las flores del arroz son de color verde blanquecino dispuestas en espiguillas, que en conjunto se denominan panoja. Una vez que ha floreado, las espigas son estrechas y colgantes. El

grano de arroz es el ovario maduro. Cuando se le quita la cáscara pardusca o pericarpio, se dice que se ha pulido. De otra forma, se trata de arroz integral, preferido por muchas personas por su alto contenido de fibra (www.siap.gob.mx).

3.6. *Flaveria bidentis*.

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

3.7. *Petunia hybrida*.

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

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

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

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

El virus del mosaico de la coliflor (CaMV) es un Caulimovirus con un rango de hospederos restringido principalmente a plantas de la familia Brassicaceae (col, coliflor, colza, mostaza); aunque también se ha reportado de manera esporádica en cacahuate, soya y casava. No se conocen efectos tóxicos para el hombre derivados del virus del 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.

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

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

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

Los genes de selección utilizados durante la fase de laboratorio para cada evento parental (GHB614, T304-40, GHB119 y COT102) se presentan en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Resumen de los genes de selección utilizados para la obtención de los eventos parentales del algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

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

1. Gen *2mepsps*.

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

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

por 445 aminoácidos y tiene un peso molecular de ~47.5 kDa. La expresión de la proteína 2mEPSPS confiere tolerancia al herbicida glifosato en las plantas de algodón.

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 fosfoenol piruvato (PEP) al 5-hidroxil de shikimato-3-fosfato (S3P) resultando en la producción de fosfato inorgánico y 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) (Alibhai & 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, lo cual contribuye con la baja toxicidad del herbicida glifosato para estos organismos (Bentley, 1990; Alibhai & Stallings, 2001; Eschenburg *et al.*, 2002). En contraste, se ha calculado que las moléculas aromáticas, todas derivadas del ácido shikímico, representan el 35% o más del peso seco de una planta (Franz *et al.* 1997). La unión del sustrato a la enzima es secuencial, iniciando con la unión del S3P y posteriormente el PEP (Boocock and Coggins, 1983). La reacción catalizada por la enzima EPSPS inicia con el rompimiento del enlace C-O del PEP (Walsh *et al.*, 1996).

2. Gen *bar*.

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

Los eventos T304-40 y GHB119 contiene el cassette de expresión *bar* que cuando se transcribe, origina la proteína PAT/*bar* 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/*bar*) (Thompson *et al.*, 1987). La presencia de la proteína PAT/*bar* en el algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confiere tolerancia a glufosinato de amonio (L-fosfinotricina).

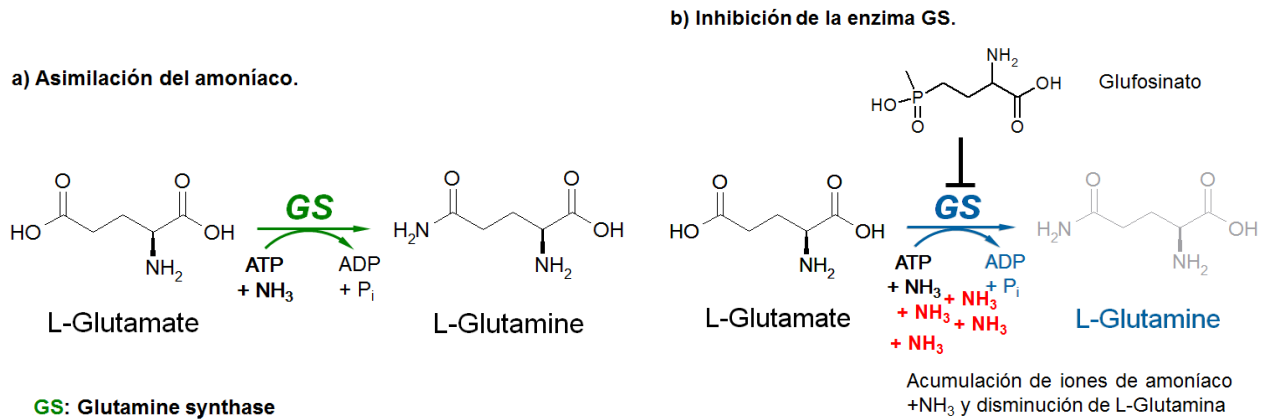
El herbicida glufosinato de amonio es una mezcla racémica de formas D y L de fosfinotricina, aunque sólo la forma L (L-fosfinotricina) tiene actividad herbicida. Este herbicida es un potente inhibidor de la enzima glutamino sintetasa (GS) tanto en bacterias como en plantas, donde se une competitivamente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

Figura 15).

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, aún siendo un

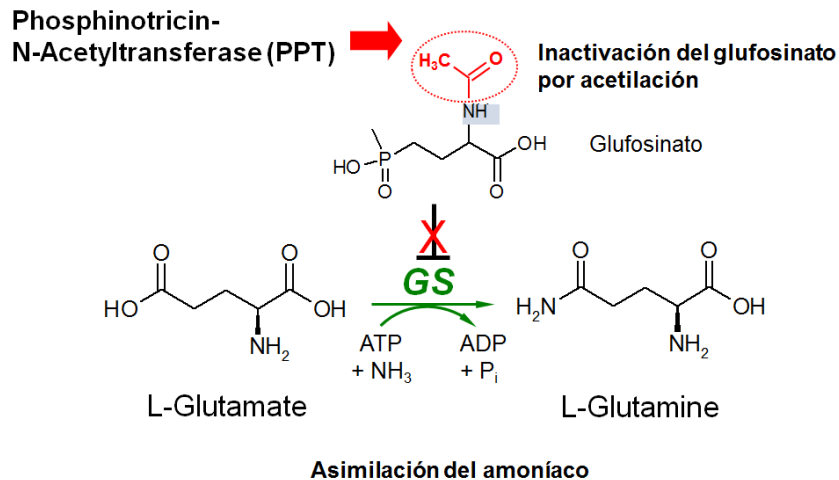
nutriente vegetal es tóxico si se encuentra en exceso y lleva a la muerte de la célula vegetal (OECD, 1999; OECD, 2002a).

Figura 15. Mecanismo de acción del herbicida glufosinato de amonio.



La enzima PAT/*bar* 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 tóxicos de amoníaco y en 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 16. Mecanismo de acción de la proteína PAT/*bar* que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.



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

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

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

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

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

1. Evento GHB614.

La estabilidad estructural del evento GHB614 fue demostrada mediante análisis *Southern blot* a través de cinco generaciones (T₃, T₄, T₅, T₆ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares. 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. 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. 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).

2. Evento T304-40.

La estabilidad estructural del evento T304-40 fue demostrada mediante análisis *Southern blot* a través de cuatro generaciones (F₁, BC₁F₁, BC₂F₁ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA. El DNA genómico del algodón T304-40 hibridado con la sonda *cry1Ab* mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados de 3100 bp y 6800 bp en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento T304-40 a nivel genómico (sección j.2).

3. Evento GHB119.

La estabilidad estructural del evento GHB119 fue demostrada mediante análisis *Southern blot* a través de tres generaciones (F₁, BC₁F₁, BC₂F₁) y en diferentes cultivares. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA produciendo dos fragmentos de hibridación. El DNA genómico del algodón GHB119 hibridado con la sonda T-DNA mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados de 3380 bp y 8890 bp en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento GHB119 a nivel genómico (sección j.2).

4. Evento COT102.

La estabilidad del evento COT102 fue analizada utilizando plantas de cinco generaciones. Se analizaron plantas individuales de las generaciones F₁, BC₁F₂, BC₂F₁, BC₂F₂ y BC₃F₁ para determinar la expresión de la proteína Vip3Aa19 (VIP3/VIP3A) mediante en ensayo cualitativo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA).

Todas las generaciones segregaron como se esperaba para un sitio de inserción único. La progenie F₁ fue producida a partir de una población homocigota y, como se esperaba, todas las plantas expresaron la proteína Vip3Aa19. Las otras cuatro generaciones evaluadas produjeron los resultados esperados con relación a la expresión de la proteína Vip3Aa19. El valor crítico de Ji cuadrada para rechazar la hipótesis nula fue de 3.84 (p=0.05) con un grado de libertad (Strickberger, 1976)³¹. Un valor menor a 3.84 indica que la herencia del gen *vip3Aa19* se comporta siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante. El sitio de inserción permanece estable a través de múltiples generaciones de autopolinización y retrocruzas (Artim *et al.*, 2003) (sección j.2).

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

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

El algodón GLTP fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614, T304-40 x GHB119 de Bayer y el evento COT102 de Syngenta (bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta). 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 T304-40 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de las proteínas Cry1Ab de la bacteria *B. thuringiensis* subsp. *berliner* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *S. hygroscopicus*. De igual manera, el evento GHB119 se produjo a través de la inserción estable en el genoma del algodón de las secuencias codificantes para las proteínas Cry2Ae de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína Vip3Aa19 de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88. La combinación de estos eventos en el algodón GLTP provee protección contra daños de insectos lepidópteros y 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, T304-40, GHB119 y COT102 demostraron el correcto patrón de integración del T-DNA, la

³¹ Los valores mayores al valor crítico se presentarían una vez en veinte oportunidades si la hipótesis es correcta.

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, T304-40, GHB119 y COT102, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GLTP. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GLTP. 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 GLTP contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

Para evaluar la estabilidad de los insertos individuales GHB614, T304-40 y GHB119 en el evento apilado GLTP, el DNA genómico de plantas de algodón GLTP fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, después de la hibridación con las sondas correspondientes del T-DNA y *Cry1Ab*, se determinó que todas las plantas de algodón GLTP analizadas mostraron fragmentos de tamaño comparable a los fragmentos obtenidos de las líneas parentales individuales para cada inserto. Asimismo, para evaluar la estabilidad del inserto individual COT102 en el evento apilado GLTP, el DNA genómico de plantas de algodón GLTP fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *NheI*, después de la hibridación con las sondas *vip3Aa19* y *aph4*, se determinó que todas las plantas de algodón GLTP analizadas mostraron fragmentos de tamaño comparable a los fragmentos obtenidos de la línea parental individual COT102, lo cual demostró la estabilidad del evento COT102 en el evento apilado GLTP.

t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados.

Las referencias del dominio público se encuentran dentro del texto.

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

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

El algodón GLTP (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7) será importado y/o movilizado en forma de semilla. En el [Cuadro 13](#) se indica la cantidad de semilla que será importada y/o movilizada, así como las fechas propuestas de importación y/o movilización.

[Cuadro 13](#). Superficie y cantidad de semilla a importar y/o movilizar para el programa experimental de algodón **GLTP** durante el ciclo PV-2020.

| Región | Periodo de importación de la semilla | Periodo de siembra | Superficie (ha) | Densidad de siembra (kg) | Cantidad de semilla requerida (kg) |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------|-----------------|--------------------------|------------------------------------|
| Chihuahua | Enero 2020 | Abril – Mayo 2020 | 15.0 | 17 | 255.0 |
| Coahuila - Durango. | Enero 2020 | Febrero – Marzo 2020 | 5.0 | 17 | 85.0 |

La semilla importada será liberada en los sitios experimentales ubicados dentro de la región agrícola de Chihuahua (Ascensión, Buenaventura, Galeana, Ahumada, Chihuahua, Aldama, Aquiles Serdán, Meoqui, Delicias, Saucillo, Julimes, Ojinaga, Rosales y Camargo), Coahuila (Matamoros, Torreón, Francisco I. Madero y San Pedro) y Durango (Tlahualililo y Gómez Palacio). En las Figuras 17 - 19 se pueden apreciar geográficamente los polígonos propuestos para la liberación experimental al ambiente del algodón GLTP durante el ciclo PV-2020.

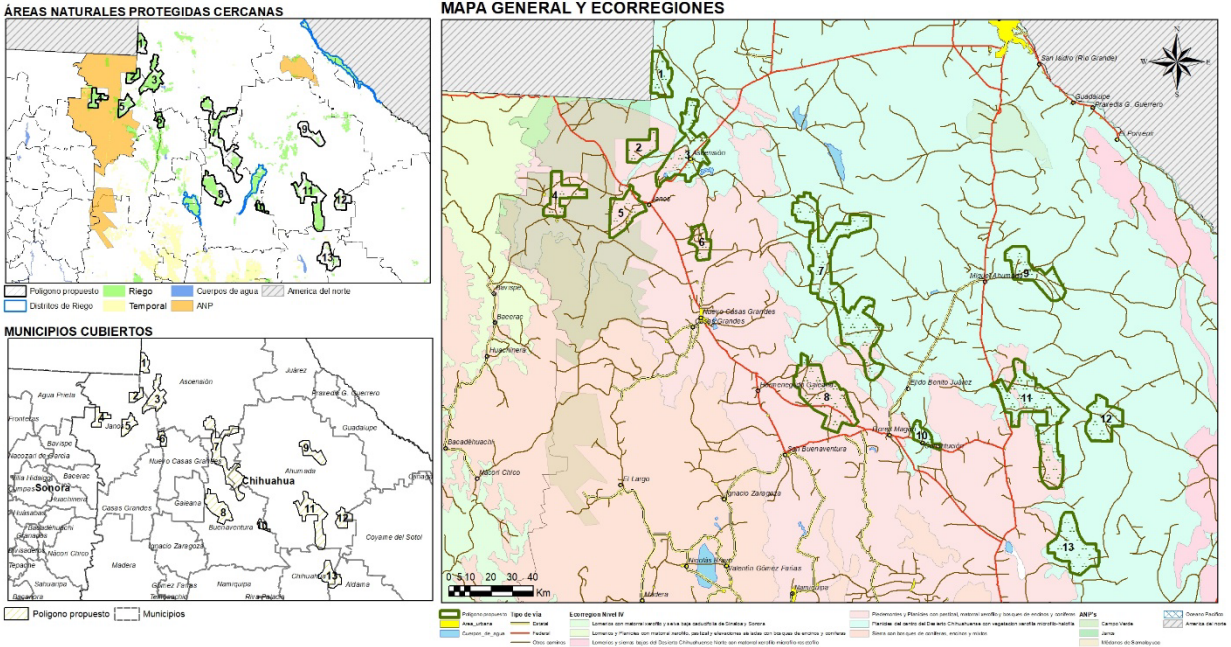


Figura 17. Polígono propuesto para la liberación de algodón GLTP en etapa experimental en la región agrícola de Chihuahua Norte

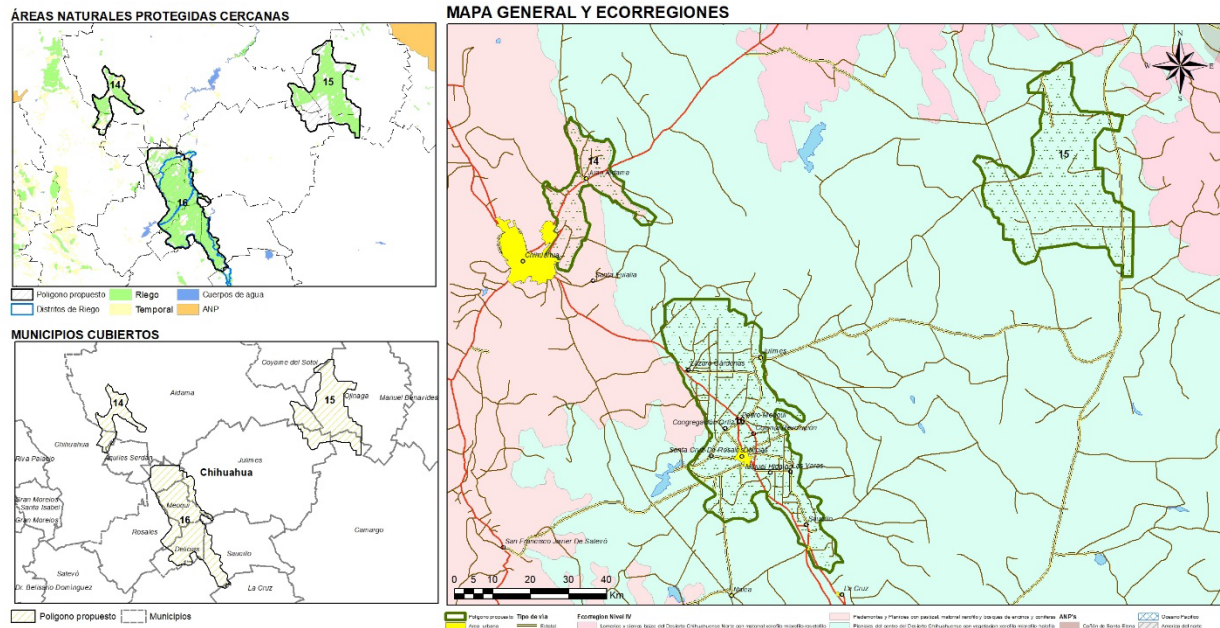


Figura 18. Polígono propuesto para la liberación de algodón GLTP en etapa experimental en la región agrícola de Chihuahua Sur.

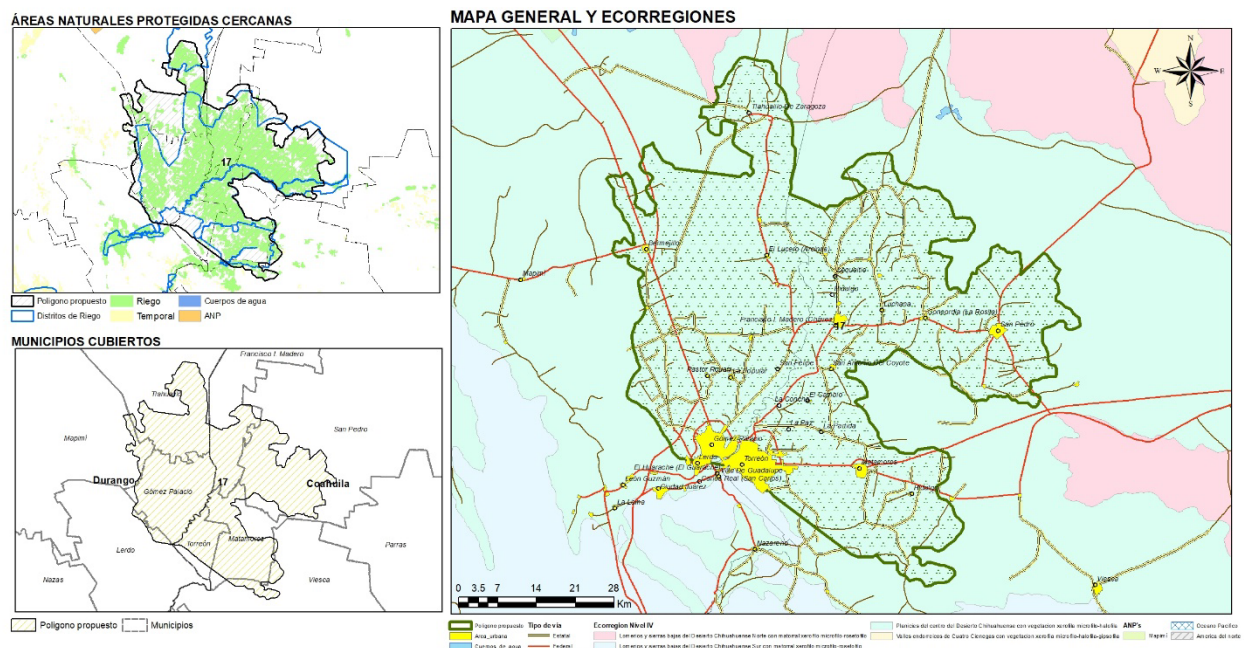


Figura 19. Polígono propuesto para la liberación de algodón GLTP en etapa experimental en la región agrícola de la Comarca Lagunera.

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 14).

Cuadro 14. 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 1° de enero | Referencia |
|---|-----------------------------|-----------------------------|--|--|
| Sonora Sur | 1° de enero - 28 de febrero | 1° de enero - 28 de febrero | - | Sistema Producto Algodón ³² |
| 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 ³³ Herrera-Andrade <i>et al.</i> , 2010 ³⁴ |
| Tamaulipas Norte | 15 de febrero - 15 de marzo | 1° de marzo - 7 de marzo | - | Loera-Gallardo <i>et al.</i> , 2015 ³⁵ |
| 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 ³⁶ Quiñones-Pando <i>et al.</i> , 2000 ³⁷ |
| 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 | 1° 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 ³⁸ |

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

El sitio o los sitiosn donde se pretende realizar las liberaciones del algodón GLTP estarán ubicados dentro de los polígonos antes mostrados. Es importante mencionar que los sitios que se utilizarán serán los que cuenten con las condiciones más favorables para el establecimiento de los ensayos, sin rebasar la cantidad solicitada para la liberación.

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

³² Sistema Producto Algodón. 2012. Plan rector del sistema producto algodón. Comité Nacional del Sistema Producto Algodón, A.C. México, D.F.

³³ 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.

³⁴ 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 Investigación Regional Del Noroeste. Campo Experimental Valle De Mexicali. Mexicali, B.C.

³⁵ 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.

³⁶ Pimentel-Alvarado, O.; Delgadillo-Aldrete, S. 2015. Agenda técnica agrícola Chihuahua. 2da Edición. SAGARPA-SENASICA-INIFAP. México.

³⁷ 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. Delcias, Chih., México.

³⁸ INIFAP. 1997. Algodón de temporal en el Sur de Tamulipas. Campo Experimental Sur de Tamaulipas-INIFAP.

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

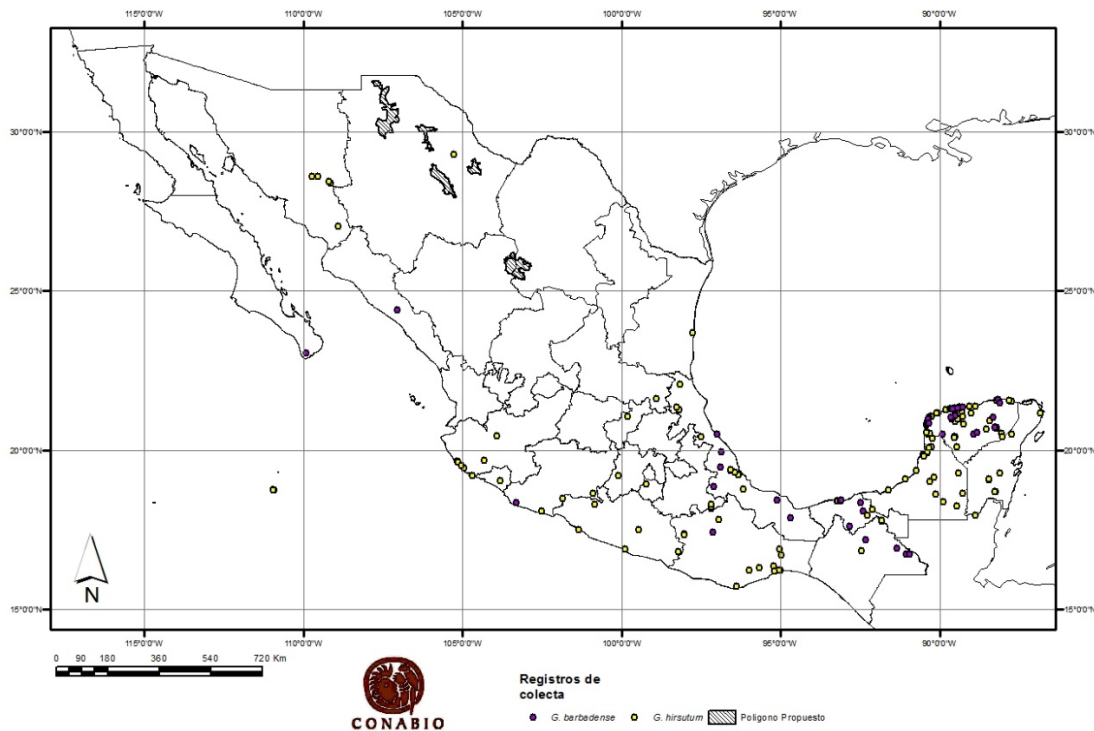
No existen especies sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*Gossypium hirsutum*) en las áreas de liberación propuestas. De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), se reportan ocho especies de *Gossypium* para la región Norte de México (Cuadro 15) Adicionalmente, la CONABIO reporta únicamente un registro de *G. 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 (Figura 20).

Cuadro 15. 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 20. Distribución puntual de *G. hirsutum* y *G. barbadense* con relación al polígono de liberación propuesto para la liberación de algodón GLTP.

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



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.

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* es poco probable lo cual es explicado por la textura y consistencia del polen producido en anthesis. 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 algodonoero son bisexuales; nacen en las axilas foliares a lo largo de las ramas fructíferas. Cada rama puede producir hasta 10 botones. Cada flor está compuesta por un cáliz

tubular, ligeramente pentalobulado, corola de cinco grandes pétalos que son de color blanco cremoso por las mañanas, color que cambia gradualmente a púrpura, después de ser fecundada.

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

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

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).

2. Descripción geográfica.

2.1. Municipios.

Los polígonos donde se realizará la liberación están ubicados en las regiones algodonerías de Chihuahua y Coahuila. Los municipios comprendidos son Ascencion, Buenaventura, Galeana, Ahumada, Chihuahua, Aldama, Aquiles Serdán, Meoqui, Delicias, Saucillo, Julimes, Ojinaga, Rosales y Camargo (Chihuahua), Matamoros, Torreon, Francisco I. Madero y San Pedro (Coahuila), Tlahualilo y Gómez Palacio (Durango) (Figura 21).

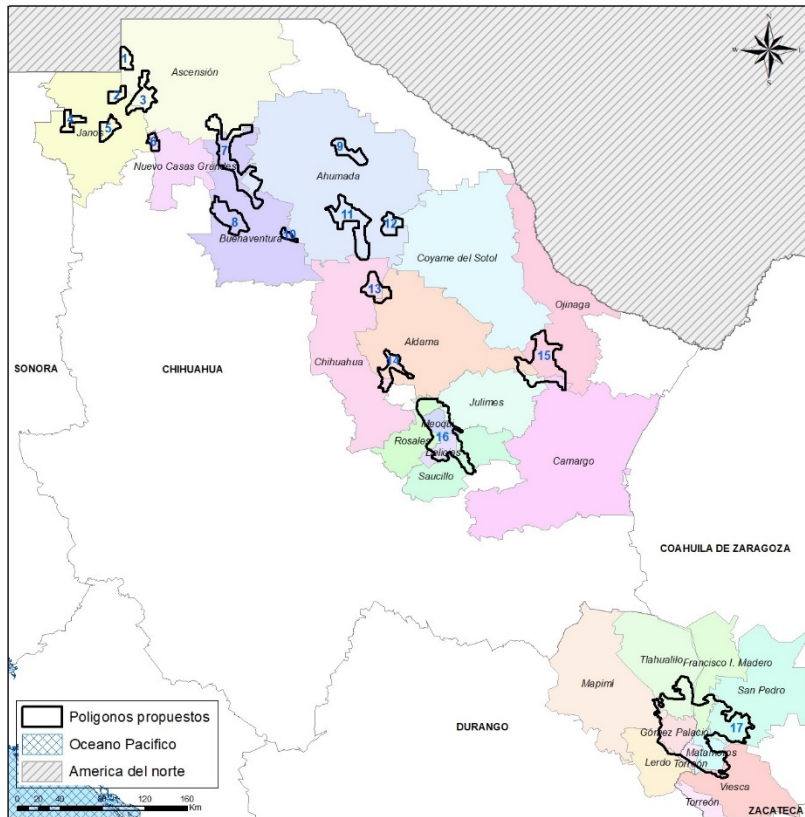


Figura 21. Polígonos de liberación de algodón GLTP en la región de Chihuahua y Coahuila.

2.1.1. Áreas Naturales Protegidas.

La liberación del algodón GLTP se hará exclusivamente dentro del polígono especificado en esta solicitud, que **no se encuentra** en las áreas naturales protegidas: **Janos, Médanos de Samalayuca, Campo Verde, Cumbres de Majalca, Cañón de Santa Elena, Ocampo, Maderas del Carmen, CADNR004, Mapimí y Cuatrociénegas** (Figura 22)

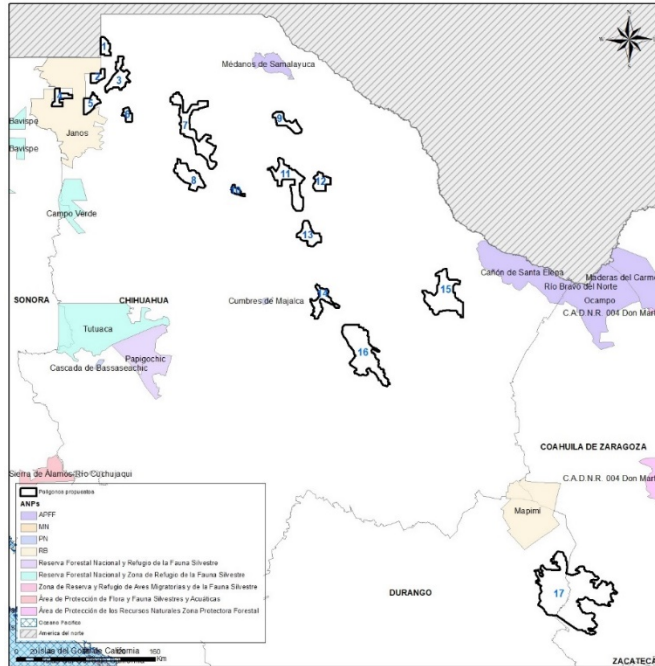


Figura 22. Áreas Naturales Protegidas cercanas a los polígonos de liberación de algodón GLTP en Chihuahua - Comarca Lagunera.

2.1.2. Distritos de Desarrollo Rural (DDR).

Los polígonos propuestos para la liberación de algodón GLTP se ubican en los Distritos de Desarrollo Rural (DDR), de Casas Grandes, El Carmen, Buenaventura, Bajo Río Conchos, Delicias, Laguna Durango y Laguna Coahuila (**Figura 23**)

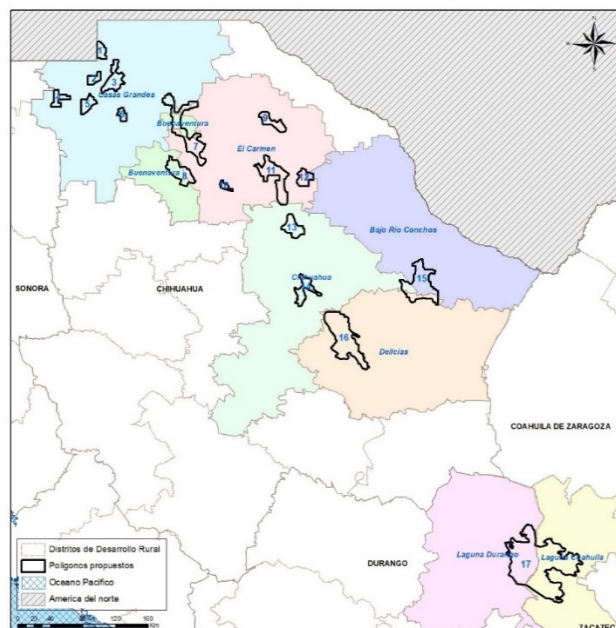


Figura 23. Distritos de Desarrollo Rural (DDR) comprendidos dentro del polígonos de liberación de algodón GlyTol® TwinLink® Plus

2.1.3. Regiones ecológicas nivel IV.

Los polígonos de liberación se encuentran situados dentro de las ecorregiones Nivel I “Desiertos de America del Norte” y “Elevaciones Semiaridas Meridionales”, comprende a su vez, en estado de Chihuahua y Coahuila dos regiones ecológicas de 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 24)

- ✓ 10.2.4.1. Planicies del centro del Desierto Chihuahuense con vegetación xerofila microfilo-halofila
- ✓ 12.1.2.1. Piedemontes y Planicies con pastizal, matorral xerofilo y bosques de encinos y coníferas.

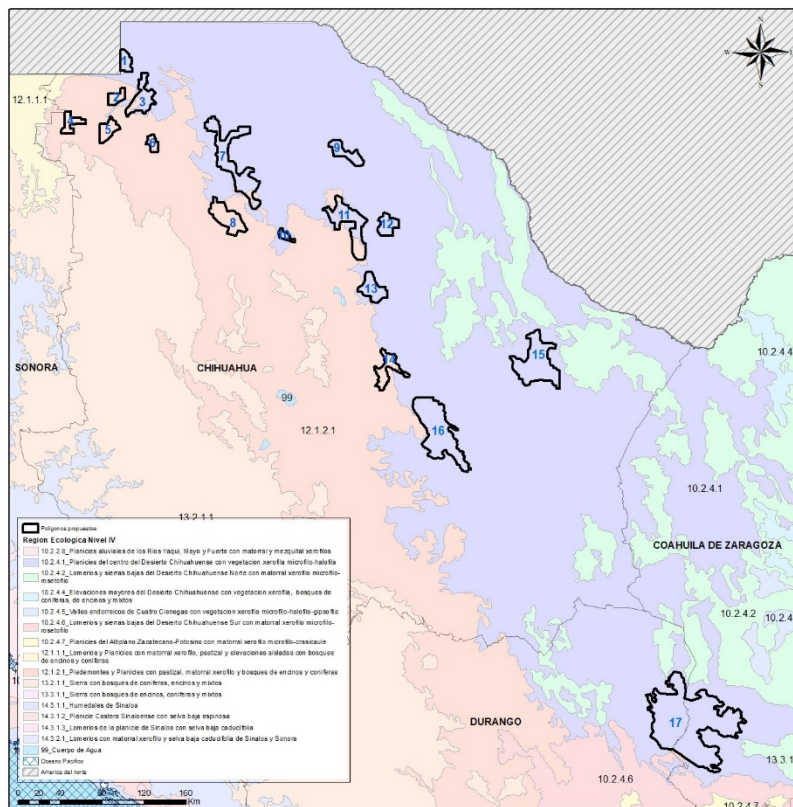


Figura 24. Regiones ecológicas nivel IV que se traslapan con la región agrícola Chihuahua – Coahuila y Durango (Comarca Lagunera).

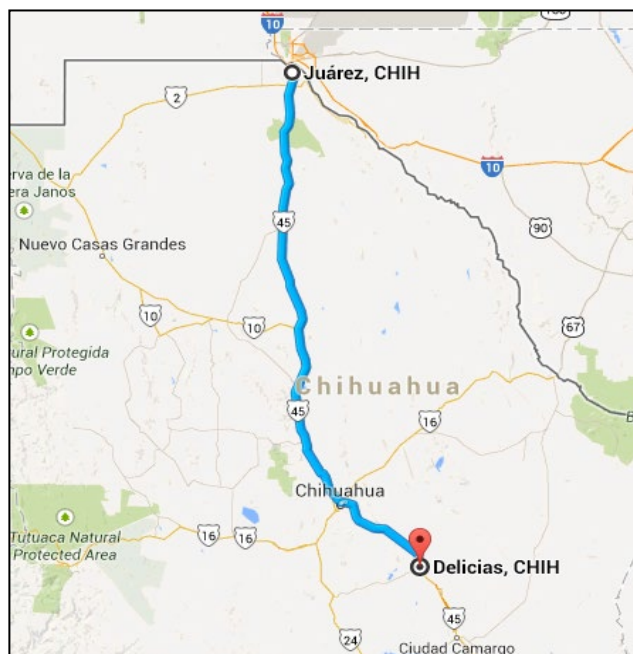
3. Plano de ubicación señalando las principales vías de comunicación.

Se presentan los mapas de la SCT de las carreteras y caminos de los Estados de Chihuahua, Coahuila y Durango, en dónde 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 25), 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 BASF, ubicado en la siguiente dirección:

Almacén Delicias

Figura 25. 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.

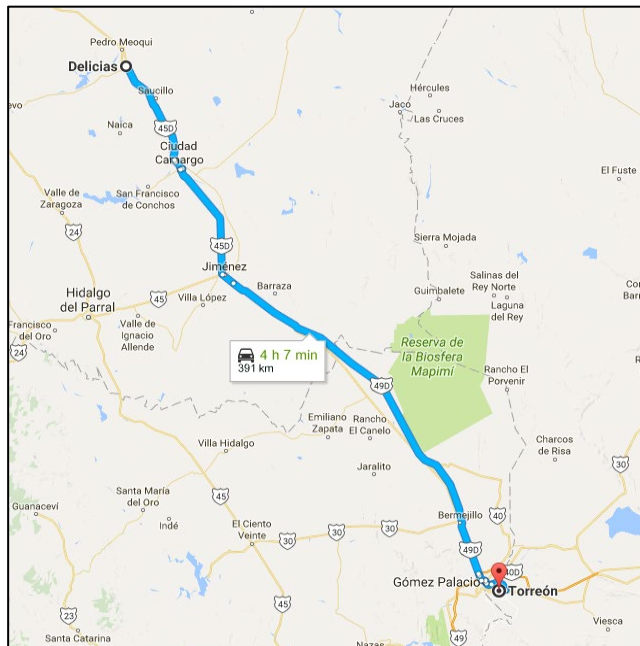
Destino: Almacén BASF.

RUTA

Carreteras: Mex 045 y 045 D

Distancia: 436 km

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



Destino: Comarca Lagunera.

RUTA

Carreteras: Mex 045, 045 D, 049, 049D, 040, 040D, 054, 057, 058, 085, 083, 081 y 080.

Distancia: 1,190 km

Puntos intermedios: Ciudad Delicias, Ciudad Camargo, Jiménez (Chihuahua), Gomez Palacio (Durango), Torreon (Coahuila).

De esta ubicación el material será trasladado por tierra a los sitios donde se realice la evaluación en la región de Chihuahua - Comarca Lagunera.

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

a) Estabilidad de la modificación genética del OGM.

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

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

1. Evento GHB614.

La estabilidad estructural del evento GHB614 fue demostrada mediante análisis *Southern blot* a través de cinco generaciones (T₃, T₄, T₅, T₆ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares. 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. 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. Adicionalmente, los datos de segregación también confirmaron la estabilidad del evento GHB614 al demostrar que segrega de manera independiente siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante (**sección I.j.2**).

2. Evento T304-40.

La estabilidad estructural del evento T304-40 fue demostrada mediante análisis *Southern blot* a través de cuatro generaciones (F₁, BC₁F₁, BC₂F₁ y BC₂F₂) y en diferentes cultivares. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA. El DNA genómico del algodón T304-40 hibridado con la sonda *cry1Ab* mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados de 3100 bp y 6800 bp en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento T304-40 a nivel genómico (sección I.j.2).

3. Evento GHB119.

La estabilidad estructural del evento GHB119 fue demostrada mediante análisis *Southern blot* a través de tres generaciones (F₁, BC₁F₁, BC₂F₁) y en diferentes cultivares. El DNA aislado de tejido foliar fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, la cual tiene dos sitios de reconocimiento en el T-DNA produciendo dos fragmentos de hibridación. El DNA genómico del algodón GHB119 hibridado con la sonda T-DNA mostró los fragmentos de integración 5' y 3' esperados de 3380 bp y 8890 bp en todas las muestras analizadas, lo cual demostró la estabilidad del evento GHB119 a nivel genómico (sección I.j.2).

4. Evento COT102.

La estabilidad del evento COT102 fue analizada utilizando plantas de cinco generaciones. Se analizaron plantas individuales de las generaciones F₁, BC₁F₂, BC₂F₁, BC₂F₂ y BC₃F₁ para determinar la expresión de la proteína Vip3Aa19 (VIP3/VIP3A) mediante ensayo cualitativo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA).

Todas las generaciones segregaron como se esperaba para un sitio de inserción único. La progenie F₁ fue producida a partir de una población homocigota y, como se esperaba, todas las plantas expresaron la proteína Vip3Aa19. Las otras cuatro generaciones evaluadas produjeron los resultados esperados con relación a la expresión de la proteína Vip3Aa19. El valor crítico de Ji cuadrada para rechazar la hipótesis nula fue de 3.84 (p=0.05) con un grado de libertad. Un valor menor a 3.84 indica que la herencia del gen *vip3Aa19* se comporta siguiendo el patrón de un *locus* mendeliano dominante. El sitio de inserción permanece estable a través de múltiples generaciones de autopolinización y retrocruzas (sección j.2).

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

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

El algodón GLTP fue desarrollado mediante cruce mendeliana convencional entre los eventos GHB614, T304-40 x GHB119 de Bayer y el evento COT102 de Syngenta (bajo contrato de licenciamiento con la Compañía Syngenta). 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 T304-40 se produjo a través de la inserción estable de las secuencias codificantes de las proteínas Cry1Ab de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. De igual manera, el evento GHB119 se produjo a través de la inserción estable en el

genoma del algodón de las secuencias codificantes para las proteínas Cry2Ae de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* y PAT/*bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. El evento COT102 se produjo mediante la inserción estable de la secuencia codificante para la proteína Vip3Aa19 de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88. La combinación de estos eventos en el algodón GLTP provee protección contra daños de insectos lepidópteros y 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, T304-40, GHB119 y COT102 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, T304-40, GHB119 y COT102, confirmó la integridad y estabilidad estructural de cada *locus* en el evento apilado GLTP. Las bandas de hibridación específicas obtenidas por *Southern blot* para los eventos individuales fueron determinadas previamente y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado GLTP. 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 GLTP contiene los insertos de DNA intactos provenientes de los eventos parentales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

Para evaluar la estabilidad de los insertos individuales GHB614, T304-40 y GHB119 en el evento apilado GLTP, el DNA genómico de plantas de algodón GLTP fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, después de la hibridación con las sondas correspondientes del T-DNA y *Cry1Ab*, se determinó que todas las plantas de algodón GLTP analizadas mostraron fragmentos de tamaño comparable a los fragmentos obtenidos de las líneas parentales individuales para cada inserto. Asimismo, para evaluar la estabilidad del inserto individual COT102 en el evento apilado GLTP, el DNA genómico de plantas de algodón GLTP fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *NheI*, después de la hibridación con las sondas *vip3Aa19* y *aph4*, se determinó que todas las plantas de algodón GLTP analizadas mostraron fragmentos de tamaño comparable a los fragmentos obtenidos de la línea parental individual COT102, lo cual demostró la estabilidad del evento COT102 en el evento apilado GLTP.

6. 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 GLTP, 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 GLTP 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 resistencia a insectos y tolerancia herbicidas después de autopolinización o retrocruzamiento del algodón GLTP con otras variedades de algodón. La resistencia a insectos y a tolerancia a herbicidas se han 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 GLTP.

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 GLTP, éste sería un proceso de translocación entre las secuencias que son homólogas entre los insertos de GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, 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 GLTP, el riesgo que podría surgir de esta recombinación hipotética es insignificante.

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

Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 fueron determinados mediante la técnica de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) y analizados estadísticamente en raíz, hoja, cuadros, bellotas, polen y semilla de algodón en los eventos parentales, así como en el evento apilado GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 en distintas etapas de desarrollo de las plantas (V4-V6, inicio de cuadros, floración y madurez). El análisis de expresión de las proteínas fue realizado a partir de muestras de ensayos de campo establecidos en regiones representativas para la producción de algodón en Estados Unidos (Georgia, Arkansas y Texas), durante el ciclo 2013. Los resultados indican que los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, Cry2Ae, Vip3Aa19, 2mEPSPS, PAT/*bar* y APH4 son similares entre el evento apilado GLTP y los correspondientes eventos parentales.

c) Características del fenotipo del OGM.

El algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102** fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614, T304-40, GHB119 y COT102. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros.

El evento **GHB614** produce la proteína 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (2mEPSPS) codificada por el gen *2mepsps* derivado del maíz (*Zea mays* L.), esta proteína confiere tolerancia al herbicida glifosato. La proteína 2mEPSPS difiere de la proteína nativa del maíz únicamente por la sustitución de dos aminoácidos.

El evento **T304-40** produce la proteína insecticida Cry1Ab codificada por el gen *cry1Ab* de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*, esta proteína es efectiva para el control de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*) y gusano tabacalero (*Heliothis virescens*). El algodón T304-40 también expresa la proteína phosphinothricin acetyl transferase (PAT/*bar*), codificada por el gen *bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, utilizado como marcador de selección y que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El evento **GHB119** produce la proteína insecticida Cry2Ae codificada por el gen *cry2Ae* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota*, esta proteína es efectiva para el control de insectos plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). El algodón GHB119 también expresa la proteína phosphinothricin acetyl transferase (PAT/*bar*), codificada por el gen *bar* derivado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, utilizado como marcador de selección y que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El evento **COT102** produce la proteína insecticida Vip3Aa19 codificada por el gen *vip3Aa19* derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* cepa AB88, esta proteína confiere resistencia al ataque de insectos lepidópteros plaga del algodón como gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), gusano tabacalero (*Heliothis virescens*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), y gusano soldado (*Spodoptera exigua*). El algodón COT102 también contiene el marcador de selección hygromycin B phosphotransferase (APH4).

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

El evento GLTP 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 las características de resistencia a insectos lepidópteros y 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 ante estímulos externos como el daño por insectos plaga y aplicaciones de los herbicidas mencionados, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional.

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

El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 (GLTP) fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614, T304-40, GHB119 y COT102. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato (proteína 2mEPSPS) y glufosinato

de amonio (proteína PAT/*bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional.

Los análisis bio-informáticos, *Southern Blot* y PCR realizados en los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 demostraron que se integró únicamente una copia del T-DNA de los *cassettes* de expresión y no se detectaron elementos del esqueleto de los vectores (plásmidos), ni secuencias adicionales que pudieran tener alguna función biológica. En adición a las características de tolerancia a herbicidas (*2mepsps* y *bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (*cry1Ab*, *cry2Ae* y *vip3Aa19*), ninguna otra característica se ha modificado como producto de la modificación genética del algodón GLTP. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas (promotores, péptidos de tránsito, terminadores) en el algodón GLTP, heredadas de los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

Las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen ventajas adaptativas al algodón en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas GLTP 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 GLTP, ni en los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, como consecuencia del proceso de transformación, ni como consecuencia del proceso de cruzamiento convencional.

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

Salvo las características de resistencia a insectos lepidópteros (genes *cry1Ab*, *cry2Ae* y *vip3Aa19*) y 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 GLTP. Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas en el algodón GLTP (heredadas de los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102) 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 las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen al algodón ventajas adaptativas en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas GLTP 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 GLTP, ni en los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, 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 resistencia a los insectos blanco (lepidópteros) y su tolerancia a herbicidas, el algodón GLTP es fenotípicamente igual que los algodones convencionales, tanto en México como en otras regiones del mundo.

El evento GLTP 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 las características de resistencia a insectos lepidópteros y 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 presión de insectos y aplicaciones de los herbicidas mencionados, en cuya ausencia no habría resultados visibles en comparación con algodón convencional.

La evaluación agronómica y fenotípica del algodón GLTP se realizó a partir de 8 ensayos de campo establecidos en diferentes regiones representativas del cultivo del algodón en los Estados Unidos durante la temporada 2013. Los ensayos fueron conducidos de acuerdo con las prácticas de manejo comerciales en cada región algodonera. Cada ensayo consistió de 6 tratamientos con 4 repeticiones (24 parcelas experimentales por ensayo) en un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA). Todas las parcelas dentro de cada sitio fueron ubicadas en el mismo campo y sometidas a las mismas condiciones de crecimiento. Los tratamientos de cada sitio incluyeron algodón GLTP con y sin tratamiento de herbicidas, contraparte convencional y 3 líneas comerciales de algodón convencional.

La elección de las variedades se basó en lo siguiente:

- **Variedad de prueba:** Se seleccionaron dos variedades genéticamente modificadas con tecnología **GLTP** cuya base genética fue la variedad convencional FM966 (Tratamientos H, I).
- **Variedad testigo:** Se seleccionó la variedad FM966 por ser la contraparte convencional de las variedades de prueba y con propósitos comparativos (Tratamiento A).
- **Variedad de referencia:** Se incluyeron seis variedades comerciales no modificadas genéticamente: FM958, FM989, ST457, DP491, S468 y Acala Maxxa, para tener un rango de referencia en la comparación de datos agronómicos (Tratamientos B, C, D, E, F, G).

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

- Días a emergencia.
- Población inicial.
- Días a primera flor.
- Días a primera bellota abierta.
- Respuesta a enfermedades.
- Acame de plantas.
- Tipo de bellota.
- Porcentaje de bellotas abiertas.
- Rendimiento de fibra.
- Peso total de cosecha.
- Propiedades de fibra.
- Número de semillas por bellota.

- Tamaño de bellota.
- Índice de semilla.
- Porcentaje de fibra.
- Mapeo final de planta.
- Altura de planta.
- Número de nudos.
- Primera rama fructífera.
- Bellotas por planta.
- Relación altura de planta/nudos totales.
- Retención de frutos en primera y segunda posición.

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

En adición al estudio de características agronómicas y fenotípicas, se analizó la característica de germinación de la semilla de algodón GLTP y convencional (FM966), mediante la prueba de germinación estándar y germinación en frío. Para la prueba de germinación estándar se utilizaron 400 semillas que se incubaron a 30 ± 2 °C y se evaluó la germinación a los 4 y 8 días. Para la prueba de germinación en frío se utilizaron 200 semillas que se incubaron a 10 ± 2 °C y se evaluó la germinación a los 3 y 8 días. Los datos obtenidos mostraron un porcentaje de germinación para la prueba estándar de 96.8% para el algodón GLTP y 96.5% para el algodón convencional FM966; asimismo para la prueba de germinación en frío los resultados fueron 94% para el algodón GLTP y 88.0% para el algodón convencional FM966. El análisis estadístico de los datos mediante la prueba exacta de Fisher ($p = 0.877$) y *ji-cuadrada* (χ^2) ($p = 0.108$) demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas para la variable de germinación entre algodón GLTP y convencional FM966.

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

1. Algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102.

El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 fue desarrollado mediante técnicas de cruzamiento convencional a partir de los eventos de transformación GHB614, T304-40, GHB119 y COT102. La combinación de los eventos biotecnológicos en el producto GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 confieren tolerancia a los herbicidas glifosato (proteína 2mEPSPS) y glufosinato de amonio (proteína PAT/*bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (proteínas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19). No se ha efectuado ninguna modificación genética adicional.

Las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen ventajas adaptativas al algodón en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas GLTP con el algodón convencional permite concluir que no existen ventajas adaptativas o un mayor potencial de convertirse en plaga o maleza en el algodón GLTP como consecuencia de la modificación genética.

Las características reproductivas no han sido alteradas en el algodón GLTP, ni en los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, 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), cascarilla (fibra para ganado vacuno) y *linter* (celulosa para productos industriales y de consumo humano) (www.cottonseed.com)³⁹. En general los análisis de composición de aceite refinado de diferentes cultivos oleaginosos, así como el análisis de *linter* procesado, han demostrado la ausencia de proteína detectable en estos productos (Hamilton *et al.*, 2002; Health Canada, 2013; Sims, *et al.*, 1995). Por lo tanto, el consumo humano significativo de las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 presentes en las variedades de algodón GLTP 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-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias. En el algodón GLTP 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.*, 2009)⁴⁰

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 estabilidad proteolítica o térmica y tiene una alta especificidad de sustrato (Herouet *et al.*, 2005)⁴¹.

³⁹ National Cottonseed Products Association (NCPA).

⁴⁰ 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.

⁴¹ 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

4. Inocuidad de las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

Los insecticidas microbiales a base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tienen una historia de uso seguro en la agricultura de alrededor de 50 años. Las proteínas Cry están entre los ingredientes activos de estos insecticidas y actualmente los genes que codifican estas proteínas han sido introducidos en diversos cultivos mediante técnicas de ingeniería genética. Lo anterior implica que las proteínas Cry han sido usadas y consumidas de forma segura por humanos y animales durante décadas (Betz *et al.*, 2000; Onose *et al.*, 2008; McClintock *et al.*, 1995). Los niveles de proteínas Cry expresadas en los cultivos GM son muy bajos y se reducen todavía más debido al procesamiento de los alimentos. Adicionalmente, la extensa evaluación de proteínas Cry en cultivos GM no han mostrado ningún daño o efecto negativo en especies no blanco, incluyendo los humanos (Koch *et al.*, 2015).

Las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae producidas por el algodón GLT con resistencia a insectos se derivan de la bacteria común del suelo *B. thuringiensis* y son específicamente tóxicas para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojaron valores de NOEL y/o NOEC⁴² en concentraciones que representan diez veces o más las concentraciones ambientales esperadas de Cry1Ab y Cry2Ae (ILSI, 2011b, Scott *et al.*, 2008).

Cuadro 16. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco.

| Especie | Método de exposición | Duración de la exposición | Resultados |
|---|---|---------------------------|---|
| Larvas de abeja (<i>Apis mellifera</i>) | Exposición a una sola dosis de proteína a 20 ppm | unidosis | NOEL >20 ppm |
| Abeja adulta (<i>Apis mellifera</i>) | Exposición a una sola dosis a 20 ppm | unidosis | No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones de prueba y de control. En el grupo de prueba, la mortalidad media fue de 16.2% |
| Larvas de crisopa (<i>Chrysoperla carnea</i>) | Exposición a 16.7 ppm | 7 días | NOEL > 16.7 ppm |
| Catarina (<i>Hippodamia convergens</i>) | Exposición a una sola dosis a 20 ppm | unidosis | NOEL > 20 ppm |
| Himenóptero parasitoide (<i>Brachymeria intermedia</i>) | Exposición a una sola dosis a 20 ppm | unidosis | NOEL > 20 ppm |
| Colémbolos (<i>Folsomia candida</i>) | Tejidos liofilizados de hojas (estimado de 50.6 µg Cry1Ab/g) | 28 días | NOEL > 50% de la dieta |
| <i>Daphnia magna</i> | Exposición a la proteína Cry1Ab en el polen del maíz en múltiples concentraciones | 48 horas | NOEC > 150 mg/L |
| Lombriz de tierra | Exposición a la proteína Cry1Ab bacteriana en un sustrato de suelo artificial | 14 días | NOEL > 200 ppm |
| Ratón (<i>Mus musculus</i>) | Sonda aguda por vía oral a 3280 mg/kg | unidosis | Efecto no observado |

Fuente: ILSI. 2011b. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ab. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134–149.

⁴² NOEL, NOEC – (Nivel de Efecto No Observado, Concentración de Efecto No Observado) – La máxima dosis en un estudio toxicológico en el cual no fueron observados efectos tóxicos.

En general muy pocas proteínas son tóxicas al ser ingeridas (Delaney *et al.*, 2008), sin embargo, para determinar la toxicidad de las proteínas en forma directa, la mejor estrategia es a través de estudios de toxicidad aguda evaluando concentraciones altas de la proteína durante un periodo corto de tiempo (Sjoblad *et al.*, 1992). Aunado a esto se cuenta con el hecho de que la exposición oral es considerada como la vía de exposición más relevante para la exposición a través de alimentos GM (Delaney *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, se realizó un estudio de toxicidad oral aguda utilizando proteína Cry1Ab producida en *E. coli* (lote MIN1443, pureza >98%), la cual es idéntica a la producida por el algodón GLT. En el estudio se utilizaron ratones hembra OF1 a los cuales se les administró una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal y todos los animales fueron observados durante un periodo de 15 días, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones OF1 y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry1Ab es mayor a 2000 mg/kg de peso corporal (Rouquie, 2007⁴³). De la misma manera, se realizó un estudio de toxicidad aguda con la proteína Cry2Ae producida en *B. thuringiensis* (lote 1410_Cry2Ae, pureza 90%) a una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, administrada vía oral a un grupo de 6 ratones macho y 6 ratones hembra C57BL/6J, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones C57BL/6J y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry2Ae es mayor a 2000 mg/kg de peso corporal (Totis, 2015⁴⁴).

5. Inocuidad de la proteína Vip3Aa19.

Las proteínas Vip3Aa producidas por el algodón **GLTP** con resistencia a insectos se derivan de las bacterias comunes del suelo *Bacillus thuringiensis* y son específicamente tóxicas para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojaron valores de NOEL en concentraciones significativamente mayores que las concentraciones ambientales esperadas de Vip3Aa (Cuadro 17).

Los estudios de campo sugieren que el cultivo de plantas de maíz y algodón GM que expresan Vip3Aa no afecta la abundancia de artrópodos no blanco, con la posible excepción de los depredadores específicos de las plagas blanco controladas por Vip3Aa. La proteína Vip3Aa en plantas puede ser tóxica para los lepidópteros no blanco, pero las evaluaciones regulatorias de riesgo para los productos aprobados han concluido que es posible reducir el riesgo cuando se lo compara con otras prácticas de control de insectos. El peso de las pruebas de los análisis de fenotipo y de composición demuestra que la expresión de Vip3Aa en los eventos aprobados de maíz y algodón no alteró la fisiología general de las plantas del cultivo e indica que dichas plantas no tienen más probabilidades de convertirse en malezas ni en invasivas que sus equivalentes convencionales (ILSI, 2012).

Cuadro 17. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco.

⁴³ Rouquie, D. 2007. Cry1Ab protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-295507-01-1.

⁴⁴ Totis, M. 2015. Cry2Ae protein. Acute toxicity study by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-508050-01-1.

| Especie | Método de exposición | Duración de la exposición | Resultados |
|---|---|---------------------------|-------------------|
| Estafilínido (<i>Aleochara bilineata</i>) | Exposición a dieta de 500 µg/g | 35 días | NOEC > 500 µg/g |
| Larvas de abeja (<i>Apis mellifera</i>) | Exposición a proteína en dieta de 500 µg/g | 24 días | NOEC > 500 µg/g |
| Larvas de crisopa (<i>Chrysoperla carnea</i>) | Exposición a 21.7 ppm | 13 días | NOEC > 21.7 ppm |
| | Exposición a dieta de 7.25 mg/g | 30 días | NOEC > 7.25 mg/g |
| Catarinas (<i>Coccinella septempunctata</i>) | Exposición a dieta de 7.25 mg/g | 15 días | NOEC > 7.25 mg/g |
| Catarina (<i>Coleomegilla maculata</i>) | Exposición a dieta de 7.24 µg/g | 20 días | NOEL > 7.24 µg/g |
| Codorniz (<i>Colinus virginianus</i>) | Exposición a 400 mg/kg de peso corporal | unidosis | NOEL > 400 mg/kg |
| <i>Daphnia magna</i> | Exposición a 10 µg/L de agua | 48 horas | NOEC > 10 µg/l |
| Lombriz (<i>Eisenia foetida</i>) | Exposición a la proteína Vip3Aa en 3.6 µg/g en suelo artificial | 14 días | NOEL > 3.6 µg/g |
| Colémbolos (<i>Folsomia candida</i>) | Exposición a dieta de 43.2 µg/g | 28 días | NOEC > 43.2 µg/g |
| Pollo (<i>Gallus domesticus</i>) | Exposición a dieta de 0.588 µg/g | 49 días | NOEC > 0.588 µg/g |
| Bagre (<i>Ictalurus punctatus</i>) | Exposición a dieta de 7.1 µg/g | 30 días | NOEC > 7.1 µg/g |
| Ratón (<i>Mus musculus</i>) | Sonda aguda por vía oral a 1250 - 3675 mg/kg | unidosis | NOEL > 3675 mg/kg |
| Chinche pirata (<i>Orius insidiosus</i>) | Exposición a dieta de 7.25 mg/g | 21 días | NOEC > 7.25 mg/g |

Fuente: ILSI. 2012. Revisión de la seguridad ambiental de Vip3Aa. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

6. Potencial como maleza.

El algodón (*Gossypium spp.*) es una planta domesticada que carece de características agresivas o de características distintivas de las especies vegetales consideradas como maleza. Esta planta ha sido cultivada por el valor de su fibra durante siglos en varios países, sin que exista ningún reporte que la clasifique como una planta invasiva o como una maleza (OECD, 2008). Investigadores y reguladores han evaluado el potencial para que las variedades de algodón GM se conviertan en maleza y han determinado que las nuevas características conferidas mediante ingeniería genética no aumentan el potencial del algodón para convertirse en una maleza agrícola, debido a que las plantas voluntarias de algodón pueden controlarse mediante técnicas convencionales de manejo de maleza (Carpenter *et al.*, 2002; Artim *et al.*, 2003, USEPA, 2008). Un ejemplo de lo anterior es el algodón en los Estados Unidos de América, en donde el cultivo fue introducido hace varios siglos y hasta la fecha no se tiene evidencia de que este cultivo se haya convertido en una maleza.

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 son altamente específicos, no deben presentar un nivel de riesgo diferente que las variedades mejoradas desarrolladas por métodos convencionales.

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 discontinua 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 continua de semillas.
- Autocompatible, pero no necesariamente auto polinizable o apomíctica.
- Si entrecruza utiliza el viento o polinizadores no especializados.
- Gran producción de semillas en condiciones favorables.
- Germinación y producción de semillas en amplia variedad de condiciones.
- Alta tolerancia o plasticidad a la variación climática y edáfica.
- Adaptaciones especiales para dispersión.
- Adaptación a las prácticas de manejo agronómico de los cultivos.
- Buena competitividad, lograda mediante compuestos alelopáticos, etc.
- Si es perenne, entonces una reproducción vegetativa vigorosa, quebradiza en los nudos inferiores o de rizomas o raíces, y capacidad de regeneración a partir de estacas.

En general la característica de maleza depende de una ventaja selectiva de muchos genes que funcionan en combinación, que no están relacionados con los genes introducidos por razones agronómicas. No se cuenta con reportes de plantas de algodón actuando como maleza en los campos agrícolas.

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

El algodón **GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102** expresa las proteínas 2mEPSPS, Cry1Ab, Cry2Ae, PAT/*bar* y Vip3Aa19 y para la detección de éstas se pueden utilizar métodos de tiras de flujo lateral (LFS), los cuales están disponibles comercialmente. Las tiras de flujo lateral (LFS) utilizan anticuerpos específicos para las proteínas expresadas en GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 y se han desarrollado y validado por EnviroLogix™ (<http://www.envirologix.com/>).

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

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

1. Mecanismos de cruzamiento con especies del genero *Gossypium*.

No existen especies sexualmente compatibles con el algodón cultivado (*Gossypium hirsutum*) en el área de liberación propuesta. De acuerdo con Fryxell (1984), Talipov *et al.* (1995), Palomo (1996) y

la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS-USDA) de Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov>), se reportan las siguientes especies de *Gossypium* para la región Norte de México (Cuadro 18).

Cuadro 18. 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> Brandege | 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 períodos de fecundidad deben coincidir; 3) se debe encontrar un vector idóneo para transportar el polen entre los dos materiales; 4) los materiales parentales deben ser sexualmente compatibles; 5) el híbrido resultante del cruzamiento debe dar origen a una semilla viable; 6) los híbridos deben ser fértiles y ecológicamente adaptados al ambiente.

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a todas las especies de *Gossypium* que no se requiere repetir para cada taxón. Todas las especies de *Gossypium* presentan autopolinización, aunque pueden presentarse ciertos cruzamientos intraespecíficos y posiblemente interespecíficos 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 delimitación de las especies, *G. barbadense* y *G. hirsutum* podrían ser clasificadas como subespecies 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

i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.

Aquella bibliografía que no es confidencial, se encuentra dentro del texto.

j) Las demás que establezcan las NOM que deriven de la Ley.

El estudio de riesgo conforme a lo establecido en la NOM-002-SAG-BIO/SEMARNAT-2017, Por la que se establecen las características y requisitos que deberán contener los estudios de los posibles riesgos que la liberación experimental de organismos genéticamente modificados pudiera ocasionar al medio ambiente y a la diversidad biológica, así como a la sanidad animal, vegetal y acuícola, se presenta adjunto a esta solicitud.

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

a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad

Las medidas y procedimientos de monitoreo que se indican a continuación tienen el objetivo de asegurar que el algodón GlyTol® TwinLink® Plus será manejado de manera responsable durante todo el proceso de liberación al ambiente, el cual incluye actividades relativas al transporte, almacenamiento, manejo, evaluación y disposición final del material genéticamente modificado.

1. Plan de monitoreo detallado.

El plan de monitoreo del algodón GlyTol® TwinLink® Plus antes de la liberación estará enfocado en las siguientes actividades:

- Obtención del Permiso de Liberación al Ambiente (PLA) correspondiente.
- Análisis del PLA y de las Medidas de bioseguridad establecidas en el mismo.
- Elaboración de convenio de investigación entre BASF Mexicana, S.A. de C.V. y una institución de investigación pública que conducirá el ensayo.
- Importación y almacenaje de la semilla en instalaciones de BASF.
- Movilización de la semilla al sitio de liberación previamente seleccionado y autorizado.
- Capacitación en el cumplimiento de medidas de bioseguridad y *stewardship* a todo el personal involucrado en la liberación (investigadores, técnicos, agricultores).

1.1. Obtención del Permiso de Liberación al Ambiente (PLA).

Antes de comenzar cualquier actividad relacionada con el algodón GlyTol® TwinLink® Plus se deberá contar con el permiso de liberación al ambiente (PLA), otorgado para la tecnología, 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 y Desarrollo Rural (SADER) y el Dictamen de Bioseguridad de la Dirección General de Impacto y Riesgo Ambiental (DGIRA) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), para que en caso de requerirlo, se realicen los ajustes necesarios en el protocolo de evaluación con el propósito de dar cumplimiento a lo establecido en el permiso.

1.3. Convenio de investigación.

Como se menciona en el documento de información confidencial, **WI-RCM-001 Realización de ensayo de campo**, es necesario que se establezca un convenio de colaboración entre BASF Mexicana, 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 documento confidencial **SOP-SGC-011 Selección y Evaluación de Proveedores** y a la **GPS 12.07. Evaluation of Third Parties, Acquisitions, and Countries of Operation**, también 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** (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** (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** (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 SAP⁴⁵.
- 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 ésta se envía al almacén de BASF 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** (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** (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.

⁴⁵ 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.

2. Los materiales para 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
- 6.
7. **Figura 26.**
8. El rótulo anterior (
- 9.
10. **Figura 26**) 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.

Figura 26. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.

BASF
We create chemistry

BASF MEXICANA, S.A. DE C.V.
Av. Insurgentes Sur 975, Col. Ciudad de los Deportes, C.P. 03710 Ciudad de México.
Tel. (55) 53 25 23 00

SEMILLA GENETICAMENTE MODIFICADA

| SEMILLA DE [Cultivo (Nombre científico)] | VARIEDAD/CODIGO: |
|--|--------------------------|
| Tecnología: XXXXXXXX | País de origen: XXXXXXXX |
| Evento: XXXXXXXX | Contenido neto *kg[: |
| Identificador OCDE: XXXXXXXXXX | |

No. 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
CP. 04100, Tel. +52 (55) 50903000 Ext. 51533

Centro de Atención Telefónica.
01 800 XXX XXXX LADA sin costo.

BASF
We create chemistry

BASF MEXICANA, S.A. DE C.V.
Av. Insurgentes Sur 975, Col. Ciudad de los Deportes, C.P. 03710 Ciudad de México.
Tel. (55) 53 25 23 00

SEMILLA CONVENCIONAL

| SEMILLA DE [Cultivo (Nombre científico)] | VARIEDAD/CODIGO: |
|--|--------------------------|
| Tecnología: NA | País de origen: XXXXXXXX |
| Evento: NA | Contenido neto *kg[: |
| Identificador OCDE: NA | |

No. 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"

Centro de Atención Telefónica.
01 800 XXX XXXX LADA sin costo.

1.5. Movilización de la semilla.

La semilla saldrá del almacén sólo cuando BASF 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** (confidencial).

Una vez que la semilla sea entregada al investigador responsable con quien BASF 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, BASF Mexicana 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® TwinLink™ Plus serán capacitadas antes del establecimiento de los ensayos con el fin de que conozcan las implicaciones y responsabilidades que conlleva la utilización de organismos genéticamente modificados bajo el contexto de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Las capacitaciones se enfocarán en:

- Biotecnología vegetal.
- Características de la tecnología GlyTol® TwinLink® Plus.
- Acciones en materia de bioseguridad.
- Responsabilidades individuales de los involucrados.
- Riesgos a la sanidad vegetal por el uso de OGM's.
- Áreas Naturales Protegidas y sitios Ramsar.
- Lineamientos de *Stewardship*.

Durante la capacitación se hará un registro de los asistentes y los capacitadores mediante un formato de lista de asistencia. 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 BASF | 3ª y 4ª semana de enero 2020 |
| Personal asistente de los investigadores | Investigadores responsables y Personal de Asuntos Regulatorios de BASF. | 3ª y 4ª semana de enero 2020 |

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

El plan de monitoreo del algodón GlyTol® TwinLink® Plus durante y posterior a la liberación estará enfocado en las siguientes actividades:

- Limpieza del equipo a utilizar (sembradora, tractor) antes y después de la siembra.
- Siembra del predio de acuerdo a la distribución indicada en el croquis del protocolo, identificando debidamente los diversos tratamientos, controles, etc.
- Evaluación de las variables indicadas en el protocolo.
- Entrada al predio restringida al personal autorizado por BASF.
- Auditorías internas por personal de Asuntos Regulatorios de BASF.
- Auditorías internas por personal de *Stewardship* de BASF.
- 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 fuera de Áreas Naturales Protegidas.

La siembra de los ensayos será realizada por el agricultor cooperante bajo la supervisión del personal de BASF y el investigador responsable, de acuerdo con la distribución indicada en el croquis del protocolo para ambas regiones Chihuahua y Comarca (Coahuila y Durango), respectivamente, 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.

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** (confidencial).

2.3. Evaluación de la tecnología.

Durante el ensayo se evaluarán las variables descritas en el protocolo de ensayo experimental referentes a fenología, efectividad de la tecnología para el control de organismos blanco, efectividad de los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio y organismos no blanco.

2.4. Acceso al ensayo.

El acceso al ensayo estará restringido al personal de BASF, 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 BASF, 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 BASF 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** (confidencial).

2.6. Auditorías internas de Stewardship.

Durante el desarrollo del ensayo el personal de *Stewardship* de BASF realizará visitas con el objetivo de asegurar que aquellos quienes manipulan el algodón GlyTol® TwinLink™ Plus realicen una gestión responsable y un manejo adecuado del mismo. La información recabada durante las visitas será registrada en el **Formulario de Inspección – Ensayos de Campo Regulados** (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 BASF 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. Destrucción de plantas voluntarias.

En el sitio de liberación se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias con el fin de detectar y destruir cualquier planta de algodón que pueda emerger posterior a la destrucción del ensayo. El monitoreo se realizará considerando los siguientes aspectos:

- El monitoreo será realizado en el sitio de liberación y en los bordes.
- Los recorridos de monitoreo se realizarán periódicamente.
- Se pondrá especial atención cuando las condiciones ambientales favorezcan la germinación de semillas (época de lluvias).
- Las plantas observadas serán destruidas de manera manual o mediante la aplicación de herbicidas.
- Se documentará el número de plantas destruidas y se elaborará un reporte de monitoreo.

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

Como se describió anteriormente, se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias posterior a la destrucción del ensayo. El monitoreo se realizará en el sitio de liberación y en los bordes, para eliminar las plantas voluntarias de algodón en caso de que existan.

Los métodos de destrucción podrán ser 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** (confidencial).

b) Medidas y procedimientos de bioseguridad.

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

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

- WI-RCM-001 - Realización de ensayos de campo.
- SOP-SGC-011 - Selección y evaluación de proveedores.
- GPS 12.07 - Evaluation of third parties.
- SOP-IMM-001 - Importación de semilla.
- RG-CMM-003 - Plan de importación.
- RG-CMM-022 – Variedades por número de lotes.
- WI-RCM-002 - Etiquetado y almacenamiento de muestras de semillas.
- GPS 12.01 – Preservation of Product Integrity.
- RG-ARC-12 - Transporte de semilla regulada.
- Checklist de limpieza de maquinaria.
- Checklist de auditoria de ensayos de campo.
- Checklist de monitoreo de plantas voluntarias.
- Hoja de transporte de semilla.

Posterior a la importación, la semilla será resguardada en el almacén de BASF ubicado en Delicias, Chihuahua.

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.

Como se mencionó anteriormente toda la semilla será etiquetada con la siguiente información.



We create chemistry

BASF MEXICANA, S.A. DE C.V.
 Av. Insurgentes Sur 975, Col. Ciudad de los Deportes, C.P. 03710 Ciudad de México.
 Tel. (55) 53 25 23 00

SEMILLA GENETICAMENTE MODIFICADA

| | |
|---|--------------------------|
| SEMILLA DE [Cultivo (Nombre científico)] | VARIEDAD/CODIGO: |
| Tecnología: XXXXXXXXX | Pais de origen: XXXXXXXX |
| Evento: | Contenido neto *kg: |
| Identificador OCDE: XXXXXXXXXX | |

No. 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.
 CP. 04100, Tel. +52 (55) 50903000 Ext. 51533

Centro de Atención Telefónica.
 01 800 XXX XXXX LADA sin costo.

Antes del inicio de la temporada de siembra, la semilla será movilizada al sitio de liberación y entregada al investigador responsable para el establecimiento del ensayo. Las medidas de bioseguridad durante el transporte incluirán:

- La semilla será transportada en empaques de papel cartón resistentes a las maniobras.
- Se registrará la cantidad de semilla enviada, variedad y el tipo de empaque utilizado.
- Se registrará la cantidad de semilla recibida, variedad y condiciones del empaque utilizado.

En caso de liberación accidental de material de algodón genéticamente modificado durante el transporte, se notificará al correo libaccidentalogm.dgiaap@senasica.gob.mx, dentro de las 24 horas siguientes que se tenga conocimiento de la misma y se informará de manera oficial en un periodo de 3 días hábiles a la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera y a la Dirección General de Sanidad Vegetal de la situación, así mismo, BASF Mexicana 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 la aplicación de herbicidas.
- Entregar un reporte al SENASICA con la documentación de las actividades realizadas.

El ensayo de algodón se establecerá preferentemente en terrenos de un Centro de Investigación Pública que cuente con control de acceso a personal externo, para evitar la entrada de personas no autorizadas. De igual manera, el ensayo se identificará claramente con letreros que indiquen que no se permite la entrada a personal NO autorizado.

Una vez que todas las evaluaciones en el ensayo sean concluidas, se procederá a realizar la destrucción del mismo mediante la incineración de todo el material vegetal resultante.

Así mismo, se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias posterior a la destrucción del ensayo que comprenderá el sitio de liberación y los bordes, para eliminar las plantas voluntarias que pudieran existir.

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

Los sitios de liberación se establecerán en zonas dónde no exista presencia de parientes silvestres de algodón, lo que constituye una barrera geográfica que impedirá cualquier interacción entre el algodón genéticamente modificado y sus parientes silvestres.

Basados en la estructura floral, no existen barreras morfológicas para la polinización cruzada. El polen es pesado y pegajoso y su dispersión por el viento es muy limitada y lo pueden transportar los insectos, en particular abejas silvestres, abejorros y abejas. Sin embargo, las especies silvestres del género *Gossypium* son diploides, mientras que las variedades cultivadas de *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* son tetraploides, esta diferencia de ploidía dificulta los entrecruzamientos, ya que pocas especies diploides producen semillas híbridas cuando son polinizadas con polen de algodón tetraploide (Niles & Faster, 1984).

De igual manera, la frecuencia de polinización cruzada disminuye al aumentar la distancia de la planta a la fuente de polen. McGregor (1976) rastreó el movimiento de polen por medio de marcaje con partículas fluorescentes y encontró que, incluso entre flores localizadas a 45 - 60 m de un campo de algodón rodeado de numerosas colonias de abejas para asegurar una buena oportunidad de transferencia de polen, las partículas se detectaron sólo en 1.6% de las flores.

El acceso al ensayo estará restringido y sólo se permitirá la entrada al investigador responsable y su equipo, personal de la DBOGM del SENASICA que realicen vistas de inspección y personal de BASF 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 BASF Mexicana S.A. de C.V., quien a su vez dará aviso al SENASICA.

Para evitar que la semilla de algodón sea trasladada accidentalmente fuera de los sitios autorizados, se realizará la inspección y limpieza de la maquinaria antes y después de la siembra del ensayo. Así mismo, se establecerá un programa de monitoreo de plantas voluntarias, cuyo objetivo será eliminar las plantas procedentes de la semilla resultante del ensayo antes de que lleguen a la etapa de floración y de esta manera reducir al mínimo la interacción del algodón genéticamente modificado con el ambiente.

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

El algodón GlyTol® TwinLink® Plus será sembrado exclusivamente en los sitios de liberación autorizados en el permiso de liberación al ambiente correspondiente, los cuales se localizarán a una distancia mínima de 100 m de poblaciones silvestres de algodón y fuera de Áreas Naturales Protegidas.

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 BASF y el investigador cooperante para asegurar que la semilla de algodón proporcionada sea utilizada únicamente para la siembra del ensayo y se contará con un inventario detallado de la cantidad de semilla enviada, recibida, sembrada y remanente.

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

El sitio experimental de algodón GlyTol® TwinLink™ Plus estará aislado de manera espacial, ya que no existen poblaciones silvestres de algodón cercanas a los sitios de liberación. Así mismo, considerando la baja capacidad de dispersión del polen de algodón, se establecerá una franja de protección de 20 metros alrededor del ensayo con algodón convencional.

Una vez finalizadas las evaluaciones, el ensayo y el bordo de protección serán destruidos y se establecerá un monitoreo de plantas voluntarias para impedir su permanencia en el ambiente.

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

5.1. Medidas de control para prevenir un evento de liberación no intencional.

Como se mencionó en la sección IV.b.1, la semilla de algodón GLTP que se utilizará para el establecimiento de los ensayos de campo en la liberación experimental será transportada, almacenada y manejada de acuerdo con procedimientos (confidenciales) que permiten prevenir una la liberación no intencional fuera de las áreas de siembra autorizada:

- WI-RCM-001 - Realización de ensayos de campo.
- SOP-SGC-011 - Selección y evaluación de proveedores.
- GPS 12.07 - Evaluation of third parties.
- SOP-IMM-001 - Importación de semilla.
- RG-CMM-003 - Plan de importación.
- RG-CMM-022 – Variedades por número de lotes.
- WI-RCM-002 - Etiquetado y almacenamiento de muestras de semillas.
- GPS 12.01 – Preservation of Product Integrity.
- RG-ARC-12 - Transporte de semilla regulada.
- Checklist de limpieza de maquinaria.
- Checklist de auditoria de ensayos de campo.
- Checklist de monitoreo de plantas voluntarias.
- Hoja de transporte de semilla.

En adición a las características de tolerancia a herbicidas (*2mepsps* y *bar*) y resistencia a insectos lepidópteros (*cry1Ab*, *cry2Ae* y *vip3Aa19*), ninguna otra característica se ha incorporado como producto de la modificación genética del algodón GLTP (sección I). Los genes de selección y demás secuencias de las construcciones genéticas insertadas (promotores, péptidos de tránsito, terminadores) en el algodón GLTP, heredadas de los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102 no le confieren ninguna característica fenotípica adicional.

Las proteínas 2mEPSPS, PAT/*bar*, Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19 no tienen efecto sobre el metabolismo normal de la planta y no se espera que la expresión de las características acumuladas produzca efectos interactivos o sinérgicos porque involucran distintos mecanismos de acción. No se espera que las características de protección contra insectos y de tolerancia a herbicidas otorguen ventajas adaptativas al algodón en hábitats naturales, en condiciones naturales o dentro de un agroecosistema. La similitud de las características de las plantas GLTP 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 GLTP como consecuencia de la modificación genética (sección I).

Las características reproductivas no han sido alteradas en el algodón GLTP, ni en los eventos individuales GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, como consecuencia del proceso de transformación, ni como consecuencia del proceso de cruzamiento convencional, cuando se compara con el algodón convencional (sección I).

5.2. Autorizaciones regulatorias de los eventos GHB614, T304-40, GHB619 y COT102.

El Servicio de Inspección de Sanidad Vegetal y Animal (APHIS, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos ha realizado el análisis de riesgo de los eventos GHB614 (GlyTol®), T304-40 x GHB619 (TwinLink®) y COT102, componentes del algodón GlyTol® TwinLink® Plus (GHB614 x (T304-40 x GHB119) x COT102) y determinó que 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 organismo no blanco o benéficos del agro-ecosistema y la falta de transferencia horizontal de genes. Por lo tanto, APHIS otorgó el estatus de NO REGULADO a los eventos: GHB614 (2009), T304-40 x GHB619 (2011) y COT102 (2005).

En México, el algodón GlyTol® TwinLink™ Plus (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102), cuenta con la autorización No. 143300913X0017 de fecha 23 de julio de 2015 (COF - 048479), expedida por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la cual determinó que el algodón GLTP es equivalente sustancialmente a su contraparte convencional y puede ser usado como pienso para alimentación en animales y subproductos para alimentación humana.

5.3. Inocuidad de la proteína 2mEPSPS.

La tolerancia al glifosato se obtiene disminuyendo la habilidad del herbicida para inhibir la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias. En el algodón GLTP 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.*, 2009⁴⁶).

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 shikimate sintasa.
- e) Se ha documentado que la proteína 2mEPSPS se degrada rápida y completamente en fluidos similares a los gástricos e intestinales, en un tiempo de 15 segundos y menos de 1 minuto, respectivamente. Esto minimiza la probabilidad de que esta proteína pueda sobrevivir en el tracto digestivo humano y sea absorbida.
- f) La proteína 2mEPSPS está presente en el evento GA21. Este evento del maíz está aprobado para su distribución comercial para uso alimentario humano y animal en varios países, desde hace varios años. Nunca se han reportado efectos dañinos para la salud humana, animal o el medio ambiente.

5.4. Inocuidad de las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae.

Los insecticidas microbiales a base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tienen una historia de uso seguro en la agricultura de alrededor de 50 años. Las proteínas Cry están entre los ingredientes activos de estos insecticidas y actualmente los genes que codifican estas proteínas han sido introducidos en diversos cultivos mediante técnicas de ingeniería genética. Lo anterior implica que las proteínas Cry han sido usadas y consumidas de forma segura por humanos y animales durante décadas (Betz *et al.*, 2000; Onose *et al.*, 2008; McClintock *et al.*, 1995). Los niveles de proteínas Cry expresadas en los cultivos GM son muy bajos y se reducen todavía más debido al procesamiento de los alimentos. Adicionalmente, la extensa evaluación de proteínas Cry en cultivos GM no han mostrado ningún daño o efecto negativo en especies no blanco, incluyendo los humanos (Koch *et al.*, 2015).

⁴⁶ 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.

Las proteínas Cry1Ab y Cry2Ae producidas por el algodón GLTP que confieren resistencia a insectos, se derivan de la bacteria común del suelo *Bacillus thuringiensis* y son específicamente tóxicas para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojaron valores de NOEL y/o NOEC⁴⁷ en concentraciones que representan diez veces o más las concentraciones ambientales esperadas de Cry1Ab y Cry2Ae (Cuadro 19) (ILSI, 2011b, Scott *et al.*, 2008).

Cuadro 19. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Cry1Ab sobre organismos no blanco.

| Especie | Método de exposición | Duración de la exposición | Resultados |
|---|---|---------------------------|---|
| Larvas de abeja (<i>Apis mellifera</i>) | Exposición a una sola dosis de proteína a 20 ppm | unidosis | NOEL >20 ppm |
| Abeja adulta (<i>Apis mellifera</i>) | Exposición a una sola dosis a 20 ppm | unidosis | No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones de prueba y de control. En el grupo de prueba, la mortalidad media fue de 16.2% |
| Larvas de crisopa (<i>Chrysoperla carnea</i>) | Exposición a 16.7 ppm | 7 días | NOEL > 16.7 ppm |
| Catarina (<i>Hippodamia convergens</i>) | Exposición a una sola dosis a 20 ppm | unidosis | NOEL > 20 ppm |
| Himenóptero parasitoide (<i>Brachymeria intermedia</i>) | Exposición a una sola dosis a 20 ppm | unidosis | NOEL > 20 ppm |
| Colémbolos (<i>Folsomia candida</i>) | Tejidos liofilizados de hojas (estimado de 50.6 µg Cry1Ab/g) | 28 días | NOEL > 50% de la dieta |
| <i>Daphnia magna</i> | Exposición a la proteína Cry1Ab en el polen del maíz en múltiples | 48 horas | NOEC > 150 mg/L |
| Lombriz de tierra | Exposición a la proteína Cry1Ab bacteriana en un sustrato de suelo artificial | 14 días | NOEL > 200 ppm |
| Ratón (<i>Mus musculus</i>) | Sonda aguda por vía oral a 3280 mg/kg | unidosis | Efecto no observado |

Fuente: ILSI. 2011b. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ab. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

En general muy pocas proteínas son tóxicas al ser ingeridas (Delaney *et al.*, 2008), sin embargo, para determinar la toxicidad de las proteínas en forma directa, la mejor estrategia es a través de estudios de toxicidad aguda evaluando concentraciones altas de la proteína durante un periodo corto de tiempo (Sjoblad *et al.*, 1992). Aunado a esto se cuenta con el hecho de que la exposición oral es considerada como la vía de exposición más relevante para la exposición a través de alimentos GM (Delaney *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, se realizó un estudio de toxicidad oral aguda utilizando la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* (lote MIN1443, pureza >98%), la cual es idéntica a la producida por el algodón GLTP. En el estudio se utilizaron ratones hembra OF1 a los cuales se les administró una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal y todos los animales fueron observados durante un periodo de 15 días, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el

⁴⁷ NOEL, NOEC – (Nivel de Efecto No Observado, Concentración de Efecto No Observado) – La máxima dosis en un estudio toxicológico en el cual no fueron observados efectos tóxicos.

tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones OF1 y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry1Ab es mayor a 2000 mg/kg de peso corporal (Rouquie, 2007⁴⁸). De la misma manera, se realizó un estudio de toxicidad aguda con la proteína Cry2Ae producida en *B. thuringiensis* (lote 1410_Cry2Ae, pureza 90%) a una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, administrada vía oral a un grupo de 6 ratones macho y 6 ratones hembra C57BL/6J, registrando todos los cambios clínicos o efectos adversos que pudieran estar relacionados con el tratamiento. Al final del estudio no se observó ninguna señal de toxicidad sistémica en los ratones C57BL/6J y se determinó que la dosis letal 50 (LD₅₀) de la proteína Cry2Ae es mayor a 2000 mg/kg de peso corporal (Totis, 2015⁴⁹).

5.5. 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 fosfotransferasas 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.*, 2005⁵⁰).

5.6. Inocuidad de las proteínas Vip3Aa19 y APH4.

La proteína Vip3Aa19 producida por el algodón GLTP con resistencia a insectos se deriva de la bacteria común del suelo *Bacillus thuringiensis* y es específicamente tóxica para ciertos insectos lepidópteros. Las pruebas de toxicidad con un rango representativo de organismos no blanco arrojaron valores de NOEL en concentraciones significativamente mayores que las concentraciones ambientales esperadas de Vip3Aa (Cuadro 20). Los estudios de campo sugieren que el cultivo de plantas de maíz GM que expresan Vip3Aa no afecta la abundancia de artrópodos no blanco, con la posible excepción de los depredadores específicos de las plagas blanco controladas por Vip3Aa. La Vip3Aa en plantas puede ser tóxica para los lepidópteros no blanco, pero las evaluaciones regulatorias de riesgo para los productos aprobados han concluido que es posible reducir el riesgo cuando se lo compara con otras prácticas de control de insectos. El peso de las pruebas de los análisis de fenotipo y de composición demuestra que la expresión de Vip3Aa en los eventos aprobados de maíz y algodón no alteró la fisiología general de las plantas del cultivo e indica que dichas plantas no tienen más probabilidades de convertirse en malezas ni en invasivas que sus equivalentes convencionales (ILSI, 2012).

⁴⁸ Rouquie, D. 2007. Cry1Ab protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-295507-01-1.

⁴⁹ Totis, M. 2015. Cry2Ae protein. Acute toxicity study by oral gavage in mice. Bayer CropScience. Sophia Antipolis Cedex. France. M-508050-01-1.

⁵⁰ 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.

Cuadro 20. Resumen de pruebas eco-toxicológicas de la proteína Vip3Aa sobre organismos no blanco.

| Especie | Método de exposición | Duración de la exposición | Resultados |
|---|---|---------------------------|-------------------|
| Estafilínido (<i>Aleochara bilineata</i>) | Exposición a dieta de 500 µg/g | 35 días | NOEC > 500 µg/g |
| Larvas de abeja (<i>Apis mellifera</i>) | Exposición a proteína en dieta de 500 µg/g | 24 días | NOEC > 500 µg/g |
| Larvas de crisopa (<i>Chrysoperla carnea</i>) | Exposición a 21.7 ppm | 13 días | NOEC > 21.7 ppm |
| | Exposición a dieta de 7.25 mg/g | 30 días | NOEC > 7.25 mg/g |
| Catarinas (<i>Coccinella septempunctata</i>) | Exposición a dieta de 7.25 mg/g | 15 días | NOEC > 7.25 mg/g |
| Catarina (<i>Coleomegilla maculata</i>) | Exposición a dieta de 7.24 µg/g | 20 días | NOEL > 7.24 µg/g |
| Codorniz (<i>Colinus virginianus</i>) | Exposición a 400 mg/kg de peso corporal | unidosis | NOEL > 400 mg/kg |
| <i>Daphnia magna</i> | Exposición a 10 µg/L de agua | 48 horas | NOEC > 10 µg/l |
| Lombriz (<i>Eisenia foetida</i>) | Exposición a la proteína Vip3Aa en 3.6 µg/g en suelo artificial | 14 días | NOEL > 3.6 µg/g |
| Colémbolos (<i>Folsomia candida</i>) | Exposición a dieta de 43.2 µg/g | 28 días | NOEC > 43.2 µg/g |
| Pollo (<i>Gallus domesticus</i>) | Exposición a dieta de 0.588 µg/g | 49 días | NOEC > 0.588 µg/g |
| Bagre (<i>Ictalurus punctatus</i>) | Exposición a dieta de 7.1 µg/g | 30 días | NOEC > 7.1 µg/g |
| Ratón (<i>Mus musculus</i>) | Sonda aguda por vía oral a 1250 - 3675 mg/kg | unidosis | NOEL > 3675 mg/kg |
| Chinche pirata (<i>Orius insidiosus</i>) | Exposición a dieta de 7.25 mg/g | 21 días | NOEC > 7.25 mg/g |

Fuente: ILSI. 2012. Revisión de la seguridad ambiental de Vip3Aa. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. USA.

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

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

La proteína APH4 no es tóxica para mamíferos ni posee características relacionadas con los

alérgenos alimentarios (Artim *et al.*, 2003⁵¹):

- a) La proteína APH4 no se detecta en la mayor parte de las muestras de semillas de algodón COT102, y cuando es detectada, los niveles de proteína están por debajo del límite de cuantificación. Se espera que eventuales trazas de la proteína APH4 presentes en las semillas de algodón, se eliminarán por los métodos estándar de procesado de la semilla.
- b) No presenta homología con toxinas o alérgenos conocidas. Se realizó una búsqueda bioinformática para comprobar si la secuencia de aminoácidos de la proteína APH4 muestra homología con proteínas que sean conocidas como toxinas. La proteína APH4 no mostró homología significativa con proteínas que son identificadas como toxinas en la base de datos GenBank.
- c) La proteína APH4 es rápidamente degradada proteolíticamente, cuando se simulan las condiciones del fluido gástrico de mamíferos, conteniendo pepsina y pancreatina.

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

La destrucción del ensayo será realizada una vez que todas las evaluaciones sean concluidas. Las plantas de algodón completas, incluida la semilla y la fibra, serán cortadas a nivel del suelo y acomodadas en montones, los cuales serán destruidos mediante incineración.

V. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROMOVENTE.

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

El país de origen del algodón GlyTol® TwinLink® Plus (GLTP) es los Estados Unidos de América y cuenta con autorización para su comercialización bajo es estatus de no-regulado desde el 22 de mayo de 2009 para el evento GlyTol® (BCS-GHØØ2-5), del 12 de octubre de 2011 para los eventos combinados TwinLink® (BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8) y del 6 de julio de 2005 para el evento COT102 (SYN-IR1Ø2-7). Es importante señalar que en este país la autorización de eventos individuales es suficiente y no es necesaria la aprobación para la utilización de estos en eventos apilados o *stacks*.

En Estados Unidos las principales áreas de liberación de algodón biotecnológico están ubicadas en la denominada franja algodонера, la cual comprende cuatro grandes regiones: sureste, oeste medio, suroeste y oeste (Figura 27). El ambiente a través de estas regiones es muy diverso, desde la costa húmeda del sureste hasta el desierto del suroeste y oeste (Zeng *et al.*, 2014), sin embargo, debido a los requerimientos ambientales del algodón, una de las principales características de esta franja es que la temperatura media en verano es mayor de 25 °C y la precipitación media anual fluctúa entre 500 y 1,270 mm, asimismo, en las regiones productores de algodón más importantes, los meses que coinciden con la etapa de madurez y cosecha son relativamente secos lo que previene el daño a la fibra. Las épocas de siembra y cosecha también son diversas, con un periodo de siembra que comprende desde marzo a junio y un periodo de cosecha entre agosto y diciembre (ERS-USDA, 2010).

⁵¹ Artim, L.; Hill, K.; Jiang, X.; Lee, M.; Mascarenhas, V.; Mullins, M.; Privalle, L.; Rabe, S.; Schriver, T.; Stein, J.; Vlachos, D.; Walters, F.; Ward, K.; Zawodny, J. 2003. Petition for the Determination of Non-Regulated Status: Lepidopteran Insect Protected VIP3A Cotton Transformation Event COT102. Syngenta Seeds, Inc. Research Triangle Park, NC 27709.

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. En el **Cuadro 21** se presentan los datos de superficie sembrada actualmente con algodón biotecnológico, así como el porcentaje que representa del total de la superficie destinada al cultivo del algodón en ese país.

Cuadro 21. Superficie sembrada con algodón *upland*^a en Estados Unidos 2016.

| Región | Superficie total algodón (ha) | Superficie algodón biotecnológico (ha) | Algodón biotecnológico (%) |
|----------------------------------|-------------------------------|--|----------------------------|
| Oeste medio (MS, LA, MO, AR, TN) | 396,591.9 | 355,442.7 | 89.6 |
| Sureste (AL, GA, NC, SC, VA, FL) | 900,425.5 | 741,671.6 | 82.4 |
| Suroeste (TX, OK, KS) | 2,033,950.0 | 1,306,203.5 | 64.2 |
| Oeste (CA, NM, AZ) | 67,582.5 | 58,239.0 | 86.2 |
| Total | 4,101,893.60 | 2,948,048.90 | 71.9 |

^a Denominación general para las variedades de algodón (*Gossypium hirsutum*) que se cultivan en Estados Unidos de América, para diferenciarlas de las variedades de *Gossypium barbadense* que se conocen con el termino genérico de algodón Pima (USDA, 1999).

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

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

Figura 28).

Figura 27. Regiones productoras de algodón de los Estados Unidos (*Cotton belt*).

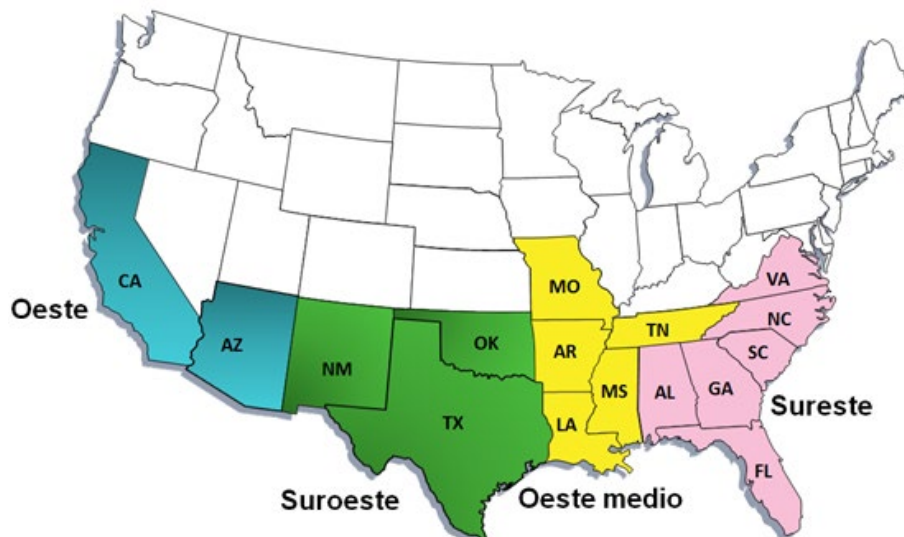
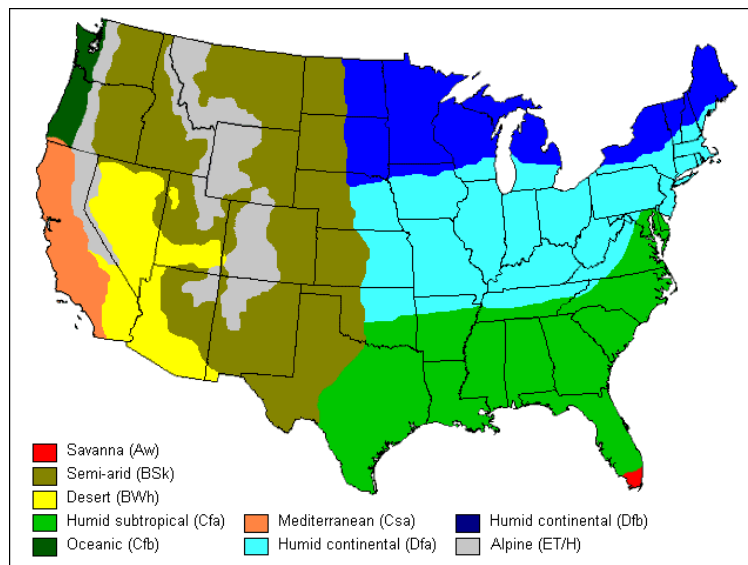


Figura 28. Principales tipos climáticos de Estados Unidos.



b) Efectos de la liberación sobre la flora y la 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 Hawai, el USDA ha determinado que "el algodón no es considerado como maleza en USA" (USDA, 1995). Resultados anteriores de la USDA durante la evaluación ambiental de algodón tolerante a herbicidas no muestran ningún cambio en el potencial de convertirse en maleza. La mayor preocupación es la de plantas voluntarias que podrían convertirse en maleza en los años siguientes. Las plantas voluntarias también están limitadas por la

geografía en los que pueden existir ya que el algodón no sobrevive como una planta perenne, por las temperaturas de congelación durante el invierno. Las plantas voluntarias pueden ser fácilmente controladas por la rotación de cultivos, la labranza y/o control manual en post-emergencia.

Por otro lado, un análisis de la composición de las plantas que contienen proteína 2mEPSPS indica que no hay cambios significativos en el contenido de gossipol de las plantas o niveles de anti nutrientes entre algodón GHB614 y su contraparte convencional. Esto indica que el algodón biotecnológico no es más tóxico que su contraparte convencional. Asimismo, las observaciones en campo indican que no han existido cambios en las poblaciones de aves, polinizadores y otras especies de vida silvestre. El algodón tolerante a herbicidas ha hecho más viables prácticas de siembra como labranza de conservación, lo que resulta en un agroecosistema 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) y la proteína 2mEPSPS no se considera que sea tóxico para mamíferos, aves o insectos. Además, la exposición a polen de algodón que contiene la proteína 2mEPSPS no es una preocupación para los organismos no blanco, debido a la baja expresión de la proteína en el polen de algodón y al hecho de que no se observaron efectos en un estudio de toxicidad aguda en niveles muy altos de la proteína (2000 mg de proteína/kg de peso corporal).

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

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

2. Tecnología TwinLink® (T304-40 x GHB119).

Los insectos son los organismos con mayor posibilidad de tener una exposición significativa al algodón T304-40 x GHB119, ya sea por alimentación directa sobre las plantas o polen, o al alimentarse de otros insectos que se han alimentado de las plantas de algodón. Las proteínas Cry

se han estudiado ampliamente durante muchos años en muchas especies de insectos. Se han generado datos adicionales sobre los efectos de Cry1Ab, Cry2Ae en insectos blanco y en especies representativas de los insectos que se encuentran en las plantas de algodón. No se observaron efectos sobre insectos predadores *Coleomegilla maculata* (catarinas), o en abejas, que podrían estar expuestas al polen de plantas de algodón T304-40 x GHB119^{52, 53}.

También existe la posibilidad de exposición a los organismos del suelo y a material vegetal. Esta exposición es muy limitada, ya que las proteínas Cry tienen una vida media muy corta en el suelo. La vida media para ambas proteínas (Cry1Ab y Cry2Ae) se determinó en los suelos típicos de las regiones productoras de algodón, dando como resultado una vida media de aproximadamente tres días para ambas proteínas. Además, ambas proteínas fueron probadas contra los colémbolos, *Folsomia candida*, ya que juegan un papel importante en la descomposición de material vegetal en el suelo. Ninguna proteína tuvo un efecto significativo sobre esta especie a concentraciones ambientales relevantes. Un estudio adicional utilizando hojas de algodón T304-40 x GHB119 no mostró ningún efecto significativo. Datos previamente generados indican que Cry1Ab presenta un riesgo mínimo para lombriz de tierra, y los datos de Cry2Ae confirman que también presenta un riesgo mínimo para esta misma especie.

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

Con referencia a la tolerancia a los herbicidas que presenta el algodón T304-40 x GHB119, se ha generado un cambio en las prácticas agronómicas que podría afectar el hábitat para los organismos no blanco. El algodón tolerante a herbicidas ha hecho más viables prácticas de siembra como labranza de conservación, lo que resulta en un agroecosistema menos perturbado debido a la reducción de labores de mantenimiento del cultivo. Un mejor desarrollo cultivo del algodón también contribuye a mejorar el hábitat para los pájaros, los insectos y otros animales que se desarrollan en cultivo (Fawcett & Towery, 2004). En resumen, la adopción de prácticas de mínima labranza o labranza de conservación, contribuyen a reducir la erosión del suelo, el consumo de combustible y otros insumos, y tiene un impacto positivo directo en el bienestar de las especies que se encuentran en entornos agrícolas. Dado que las poblaciones de malezas se controlan en general con dos aplicaciones herbicidas, el uso de cultivos tolerantes a los herbicidas contribuye a que por lo menos, no se añada una carga adicional sobre los organismos no blanco, por lo tanto, se puede concluir que las proteínas expresadas por el algodón T304-40 x GHB119 no representan un riesgo significativo para la flora y fauna.

3. Tecnología COT102.

Después de realizar una serie de estudios durante varios ciclos agrícolas se ha logrado concluir que no hay efectos indeseados con respecto a las características de las plantas para convertirse en plagas. No existe un impacto ambiental significativo reportado para la familia de las proteínas *Bt* demostrados en los productos microbianos y proteínas incorporadas a las plantas de algodón.

⁵² ILSI. 2011. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ab. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C.

⁵³ ILSI. 2013. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry2Ab. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C.

Además, en todos los casos que la proteína Vip3Aa19 fue probada para evaluar su impacto en los organismos no blanco no se determinaron efectos adversos y la concentración sin efecto observable (NOEC), fue comparativamente más alta que la concentración ambiental máxima, lo cual corrobora que representa un riesgo mínimo para los organismos no blanco⁵⁴.

Durante la evaluación de organismos no blanco, se realizó la evaluación del polen de algodón COT102 mediante la exposición de 21 días *in vitro* de larvas de abejas (*Apis mellifera* L.) de segundo instar (24 a 48 horas de edad), las larvas fueron transferidas a placas en los días 4 a 8 y mantenidas a una temperatura que varió entre 31 a 35 °C realizando la prueba casi en total oscuridad. Se alimentaron con dos dietas diferentes, la primera contenía 46 mg de polen de algodón convencional/g de dieta y la segunda con 46 mg de polen de algodón COT102/g de dieta, así como un control de dieta sin polen. Al final se concluye que no se detectó ninguna diferencia estadística entre las dos fuentes de polen ensayados en relación con el control.

Dentro del análisis de otros insectos no blanco se ha probado en organismos como *Coleomegilla maculata*, mediante el análisis de toxicidad crónica al incluir en su dieta cantidades de polen con la proteína Vip3Aa19, utilizando adultos con 8 a 9 días de edad, éstos fueron alimentados con dieta que contenía el 5% w/w (equivalente a 40 µg de proteína Vip3Aa19/g de dieta) y un control negativo. Después de 21 días de exposición sobrevivieron el 93% de los individuos sometidos a la dieta con proteína Vip3Aa19 comparado contra un 97% de individuos con el control negativo, lo cual nos permite concluir que el NOEC es 56% de concentración de polen con la proteína Vip3Aa19 (concentración más alta muestreada) lo cual es equivalente a 7.24 ppm de proteína Vip3Aa19.

Además de las especies presentadas anteriormente, debido a la falta de evidencia que demuestre la toxicidad Vip3Aa19, no se espera que grupos tales como escarabajos (Coleóptera), libélulas (Odonata), moscas (Díptera), naucoris (Hemíptera) y chapulines (Ortóptera), sean sensibles a la proteína.

En su evaluación de la seguridad ambiental de las proteínas Bt incorporadas a las plantas, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) llevó a cabo una extensa revisión de la información relevante que describe el potencial teórico para la transferencia horizontal de genes, es decir, la posibilidad de que los genes de los cultivos *Bt*, incluidos los genes marcadores, puedan ser transferidos a los organismos del suelo⁵⁵. Se concluye que la posibilidad de que esto ocurra es poco probable y que las consecuencias potenciales de la transferencia horizontal de genes, si ocurriera, no presentaría ningún riesgo significativo. Esta evaluación también es relevante para las plantas de algodón evento COT102 y sus derivados o eventos apilados, que expresan el gen *vip3Aa19* de *Bacillus thuringiensis* y el gen marcador *aph4* aislado de *E. coli*. Ambos genes (o genes con homología y equivalencia funcional) se sabe que están presentes de forma natural en las poblaciones microbianas del suelo.

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

Para otorgar la des-regulación de los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) evaluó los efectos de las proteínas expresadas por dichos eventos (2mEPSPS, Cry1Ab, Cry2Ae, PAT/*bar*, Vip3Aa19 y APH4), sobre factores bióticos (organismos no blanco, fauna, como alimento para ganado, etc.) y abióticos (suelo

⁵⁴ ILSI. 2012. Revisión de la seguridad ambiental de Vip3Aa. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C.

⁵⁵ U.S. Environmental Protection Agency. 2001. Biopesticides Registration Action Document. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant-Incorporated Protectants.

y mantos acuíferos). Como resultado de las evaluaciones, la autoridad antes citada autorizó la desregulación para los eventos GHB614, T304-40, GHB119 y COT102.

Dentro de los estudios de riesgo que se pueden analizar encontramos algunos investigadores que evaluaron la posibilidad de flujo de polen entre las especies de algodón. Van Deynze *et al.* (2005) midieron el flujo de genes mediado por el polen (PGF) en cuatro direcciones durante 2 años, además, se tomaron muestras de los campos de variedades convencionales a diferentes distancias de los campos sembrados con variedades transgénicas para evaluar el flujo de polen en condiciones de producción comercial. Los resultados fueron que el flujo era independiente de la dirección de la fuente de polen y disminuyó exponencialmente con el aumento de la distancia desde 7.65% a 0.3 m, a menos de 1% más allá de 9 m, cuando había una alta actividad de los polinizadores. En ausencia de poblaciones de polinizadores (abeja, *Apis mellifera* L.). El flujo fue inferior al 1% más allá de 1 m. El flujo de polen en campos comerciales fue consistente con los datos experimentales, con sólo 0.04% de flujo detectado en 1625 m. Este estudio confirma que el flujo de genes disminuye exponencialmente con la distancia en algodón cultivado y es baja en ausencia de polinizadores, aunque se puede detectar ocurrencia esporádica de flujo hasta 1625 m.

Otros estudios evalúan el efecto de las proteínas insecticidas sobre polinizadores, tal es el caso del reportado por Duan *et al.* (2008⁵⁶), quien realizó un estudio en las abejas (*Apis mellifera* L.) que son los polinizadores más importantes de muchos cultivos agrícolas en todo el mundo y son una especie de prueba clave que se utilizan en la evaluación de la seguridad de los cultivos resistentes a los insectos genéticamente modificados. Existe la preocupación de que la siembra generalizada de estos cultivos transgénicos podría dañar las poblaciones de abejas. Se realizó un meta-análisis de 25 estudios que evaluaron de forma independiente los efectos potenciales de las proteínas Cry de *Bt* en la supervivencia de la abeja (o mortalidad). Los resultados muestran que las proteínas Cry de *Bt* utilizadas en los cultivos modificados genéticamente comercializados para el control de plagas de lepidópteros y coleópteros, no afectan negativamente a la supervivencia de las larvas o de adultos en el laboratorio. Aunque las presiones adicionales que las abejas enfrentan en el campo podrían, en principio, modificar su susceptibilidad a las proteínas Cry o dar lugar a efectos indirectos, estos hallazgos apoyan las evaluaciones de seguridad que donde no se han detectado efectos negativos directos de los cultivos *Bt* para este insecto polinizador vital.

B. thuringiensis es una bacteria del suelo que forma esporas durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento. Las esporas contienen cristales, que comprende predominantemente una o más proteínas Cry o Cyt (también conocidos como d-endotoxinas) que tienen actividad insecticida potente y específico. Las diferentes cepas de *Bt* producen diferentes tipos de toxinas, cada uno de los cuales afecta a un grupo taxonómico estrecho de insectos. Por lo tanto, las toxinas de *Bt* se han utilizado como insecticidas tópicos para proteger los cultivos y, más recientemente, las proteínas se han expresado en plantas transgénicas para conferir resistencia inherente a algunas plagas. Los cultivos transgénicos *Bt* han sido abrumadoramente exitosos y benéficos, lo que lleva a mayores rendimientos y reducción en el uso de plaguicidas químicos y combustibles fósiles. Sin embargo, su despliegue ha atraído algunas críticas en particular con respecto a la posible evolución de cepas de insectos resistentes. Sanahuja *et al.* (2011⁵⁷) examinaron los progresos recientes en el desarrollo de la tecnología *Bt* y las contramedidas que se han introducido para prevenir la selección de poblaciones de insectos resistentes.

⁵⁶ Duan, J.J.; Marvier, M.; Huesing, J.; Dively, G.; Huang, Z.Y. 2008. A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). PLoS ONE 3(1): e1415.

⁵⁷ Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.M.; Capell, T.; Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnology Journal 9: 283–300.

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 piruvylshikimate-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 piruvylshikimate-3-fosfato sintasa (2mEPSPS). La proteína 2mEPSPS, con una menor afinidad de unión para el glifosato, es altamente resistente a la inhibición por glifosato y por lo tanto permite la actividad enzimática suficiente para que las plantas se desarrollen en la presencia de herbicidas a base de glifosato. En base a una revisión de la literatura publicada y estudios experimentales, se evaluaron los posibles efectos relacionados con la proteína 2mEPSPS. La evaluación de seguridad determinó que la proteína expresada es inocua. La enzima 2mEPSPS no posee ninguna de las propiedades asociadas a toxinas o alérgenos conocidos, como la falta de similitud con secuencia de aminoácidos de toxinas y alérgenos conocidos, una rápida degradación en los fluidos gástricos e intestinales simulados, y sin efectos adversos en ratones después de ser expuestos por vía intravenosa o vía oral (a 10 o 2000 mg/kg de peso corporal, respectivamente). En conclusión, existe una certeza razonable de ningún daño resultante de la exposición a la proteína 2mEPSPS en la alimentación humana o en la alimentación animal (Herouet-Guicheney *et al.*, 2009).

Rouquie (2006b) evaluó el potencial de similitud de la secuencia aminoácidos de la proteína doble mutante del maíz 5-enol piruvylshikimate-3-fosfato sintasa (2mEPSPS) con toxinas o alérgenos conocidos. La comparación de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS se llevó a cabo mediante un estudio en general de homología de la secuencia de aminoácidos con todas las secuencias de proteínas presentes en las siguientes bases de datos de referencia: Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PIR, NRL-3D, DAD y Genpept. El algoritmo utilizado fue BLASTP 2.2.2 y la matriz de puntuación usada fue BLOSUM62. El criterio que indica la posible toxicidad o alergenicidad era una identidad del 35% en una ventana de 80 aminoácidos con una toxina o proteína alergénica. Los resultados de la búsqueda general de homología con la proteína 2mEPSPS no mostraron ninguna identidad con toxinas o alérgenos conocidos, sólo con otras proteínas EPSPS, de diversos orígenes que tienen un excelente historial de seguridad. En conclusión, los resultados apoyan que es poco probable que el gen *2mepsps* codifique proteínas tóxicas o alergénicas).

Como se desprende del inciso anterior, el algodón T304-40 x GHB119, el algodón GHB614 y el algodón COT102, no representan riesgo alguno para el ambiente, ni para la flora o la fauna. Por lo tanto, los resultados de liberaciones experimentales tanto en el país de origen como en otros, muestran que algodón GlyTol® TwinLink® Plus (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7), es igual que sus progenitores y por consiguiente seguro.

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

Entre las principales plagas lepidópteras del algodón se encuentran el complejo bellotero (*Heliothis virescens* Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie), el gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith). El control de estas plagas se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro (Cuadro 22), los cuales han tenido un impacto negativo en el ambiente y el uso irracional de estos productos ha generado resistencia en las plagas a un gran número de insecticidas (Pacheco, 1994; Hake *et al.*, 1996; Machain *et al.*, 1988; Machain *et al.*, 1995).

Cuadro 22. Productos, categoría toxicológica y grupo químico de los principales insecticidas recomendados para el control de insectos lepidópteros en algodón (PLM, 2006).

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

El algodón GLTP expresa las proteínas insecticidas Cry1Ab, Cry2Ae y Vip3Aa19, las cuales actúan de manera específica sobre algunas especies de insectos lepidópteros que son plagas de importancia económica en el cultivo del algodón, tales como el complejo bellotero (*Heliothis virescens*

Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella* Saunders), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith)

La expresión de tres proteínas insecticidas que actúan en forma independiente en una misma planta, se constituye en una nueva herramienta para retrasar de manera efectiva la aparición de resistencia a las toxinas de Bt en las poblaciones de insectos plaga, reforzando principalmente la acción efectiva en contra de gusano bellotero (*Heliothis virescens* Fabricius y *Helicoverpa zea* Boddie) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) que actualmente representan un serio problema en los cultivos de algodón. Adicionalmente y con la finalidad de disminuir la posibilidad de resistencia se siembra una porción de la superficie cultivada con algodón que no expresa proteínas de *B. thuringiensis* que servirá como área de refugio, la cual sirve como una reserva natural de insectos susceptibles, permitiendo que la eficacia de las proteínas insecticidas se mantenga.

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

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

El país de origen del algodón GLTP (GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102) es los Estados Unidos de América y de acuerdo con la legislación del país de origen y a la autoridad encargada de su aprobación Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), el algodón GLTP, por ser un producto de cruzamiento convencional de dos eventos independientes, no necesita una aprobación como evento apilado en el país de origen. Se han presentado a la Autoridad los documentos legalizados que acreditan la autorización en el país de origen de los eventos GHB614 y (T304-40 x GHB119).

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

Cuadro 23. Resumen de aprobaciones internaciones para consumo, procesamiento y cultivo del algodón COT102 (OECD: SYN-IR1Ø2-7).

| País | Consumo humano | Consumo animal | Cultivo |
|---------------|----------------|----------------|---------|
| Australia | 2005 | | |
| Canadá | 2011 | 2011 | |
| Colombia | 2016 | | |
| Japón | 2012 | 2012 | |
| México | 2010 | 2010 | |
| New Zealand | 2005 | | |

| | | | |
|---------------------------|------|------|------|
| Philippines | 2015 | 2015 | |
| South Korea | 2014 | | |
| Taiwan | 2015 | | |
| Estados Unidos de América | 2005 | 2005 | 2011 |

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

Cuadro 24. Resumen de aprobaciones internacionales para consumo, procesamiento y cultivo del algodón GHB614 (OECD: BCS-GHØØ2-5).

| País | Consumo humano | Consumo animal | Cultivo |
|---------------------------|----------------|----------------|---------|
| Australia | 2009 | | |
| Brasil | 2010 | 2010 | 2010 |
| Canadá | 2008 | 2008 | |
| China | 2010 | 2010 | |
| Colombia | | 2012 | |
| Costa Rica | | | 2009 |
| Unión Europea | 2011 | 2011 | |
| Japón | 2010 | 2010 | |
| México | 2008 | | |
| New Zealand | 2009 | | |
| South Korea | | 2010 | |
| Taiwan | 2015 | | |
| Estados Unidos de América | 2009 | 2009 | 2009 |

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

Cuadro 25. Resumen de aprobaciones internacionales para consumo, procesamiento y cultivo del algodón T304-40 x GHB119 (OECD: BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8).

| País | Consumo humano | Consumo animal | Cultivo |
|---------------------------|----------------|----------------|---------|
| Brasil | 2011 | 2011 | 2011 |
| Canadá | | 2011 | |
| México | 2012 | | |
| Estados Unidos de América | 2011 | | |

Fuente: www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/; 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, 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 *A. tumefaciens* cepa CP4 que es altamente tolerante al glifosato porque su enzima EPSPS es menos sensitiva que la 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 aborto de frutos y pérdida de rendimiento. Actualmente existen variedades 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 amoníaco en glutamina. La inhibición de la glutamina sintetasa provoca una acumulación de amoníaco y glioxilato que causa daños a la estructura de los cloroplastos, disminución de la fotosíntesis y finalmente la muerte de los tejidos. El algodón resistente a glufosinato fue comercializado por primera vez en 2004 como algodón Liberty Link (LL) y fue creado a través de la inserción del gen *bar* aislado de la bacteria del suelo *Streptomyces hygroscopicus*. El algodón LL transformado con el gen *bar* expresa resistencia a glufosinato a través de la inactivación de la acción del herbicida. El algodón LL tiene una excelente tolerancia al glufosinato, que es un herbicida no selectivo con acción primordialmente de contacto y puede aplicarse desde la emergencia hasta los inicios de la floración. El glufosinato controla tanto malezas gramíneas como de hoja ancha, pero requiere aplicarse en malezas en sus primeros estados de desarrollo, pues su acción es de contacto y no deja residuos en el suelo que puedan afectar a cultivos sembrados en rotación (Rosales y Sánchez, 2010).

La tecnología GlyTol® TwinLink® Plus (GLTP) combina la resistencia a las plantas de algodón al ataque de insectos lepidópteros, con la tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio.

Con relación al manejo de maleza en algodón, las variedades GlyTol® TwinLink™ Plus son tolerantes a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato mediante la expresión de las proteínas PAT de *S. 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.

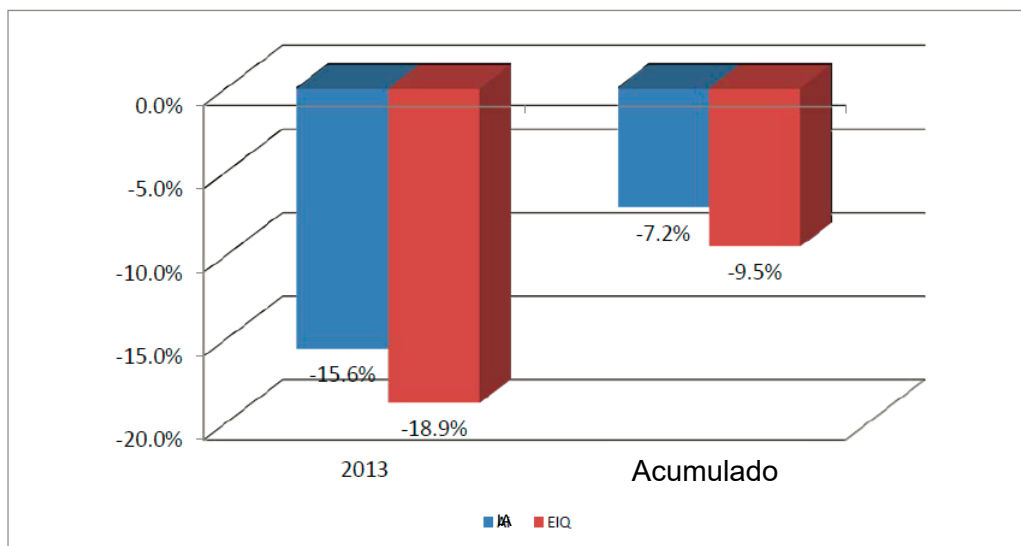
Adicionalmente, el uso de cultivos tolerantes a herbicidas ofrece una serie de ventajas de carácter agronómico y ambiental:

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 29).

- Disminución de la contaminación del suelo y mantos freáticos al utilizar herbicidas con menor impacto ambiental (Cuadro 26).

- Mayor flexibilidad en el control de maleza comparado con el uso de herbicidas en el algodón convencional: en los cultivos tolerantes a herbicidas, estos se aplican en post emergencia a la maleza y al cultivo 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 27 - 28).
- 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 29).

Figura 29. 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 26. Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ) de los principales herbicidas recomendados para el control de maleza en algodón.

| Ingrediente activo (I.A.) | Grupo químico | EIQ |
|---------------------------|------------------------|-------|
| Oxifluorfen | Difenileter | 33.82 |
| Pendimetalin | Dinitroanilina | 30.17 |
| Fluazifop-p-butil | Arilofenoxi propionato | 28.71 |
| Diuron | Dimetilurea | 26.47 |
| Bensulide | Organofosforado | 26 |
| Quizalofop-etil | Arilofenoxi propionato | 22.14 |
| Piritiobac sodio | Pirimidincarboxy | 21.7 |
| Setoxidim | Ciclohexanediona | 20.89 |
| Glufosinato de amonio | Ácidos fosfínicos | 20.2 |
| Clomazone | Isoxazolidinona | 19.63 |
| Linuron | Fenilurea | 19.32 |
| Trifluralina | Dinitroanilinas | 18.83 |
| MSMA | Arsénico orgánico | 18 |
| Alaclor | Cloroacetamida | 17.86 |
| Clethodim | Ciclohexanediona | 17 |
| Prometrina | Triazina | 15.37 |
| Glifosato | Glicinas | 15.33 |
| Fluometuron | Fenilurea | 14.27 |

Fuente: A method to measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: list of Pesticides, Part 3: Herbicides 2012. Integrated Pest Management. Disponible en: www.nysipm.cornell.edu

Cuadro 27. 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 |

| Nombre científico | Familia botánica | Clasificación morfológica |
|--|------------------|---------------------------|
| <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 |
| <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 28. 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 |

| Nombre científico | Familia botánica | Clasificación morfológica |
|---|------------------|---------------------------|
| <i>Bidens pilosa</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Galinsoga parviflora</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Parthenium hysterophorus</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Melampodium divaricatum</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Anoda cristata</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Aldama dentada</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Helianthus ciliaris</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Taraxacum officinale</i> | Asteraceae | Hoja ancha |
| <i>Amaranthus spinosus</i> , <i>A. hybridus</i> , <i>A. palmeri</i> | Amaranthaceae | Hoja ancha |
| <i>Capsella bursa-pastoris</i> | Brassicaceae | Hoja ancha |
| <i>Lepidium virginicum</i> | Brassicaceae | Hoja ancha |
| <i>Ipomonea purpurea</i> | Convolvulaceae | Hoja ancha |
| <i>Convolvulus arvensis</i> | Convolvulaceae | Hoja ancha |
| <i>Euphorbia hirta</i> | Euphorbiaceae | Hoja ancha |
| <i>Acalypha alopecuroide</i> | Euphorbiaceae | Hoja ancha |
| <i>Sida acuta</i> | Malvaceae | Hoja ancha |
| <i>Malva parviflora</i> | Malvaceae | Hoja ancha |
| <i>Melilotus indicus</i> | Fabaceae | Hoja ancha |
| <i>Oxalis latifolia</i> | Oxalidaceae | Hoja ancha |
| <i>Portulaca oleracea</i> | Portulacaceae | Hoja ancha |
| <i>Solanum nigrum</i> | Solanaceae | Hoja ancha |
| <i>Chenopodium album</i> | Chenopodiaceae | Hoja ancha |
| <i>Commelina serrulata</i> | Commelinaceae | Hoja ancha |

Fuente: Etiqueta Faena® Fuerte (363 g de i.a) - Monsanto, Etiqueta Glyfos® (360 g de i.a.) - Cheminova Agro, Etiqueta Durango™ (480 g de i.a) – Dow AgroSciences.

Cuadro 29. 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).

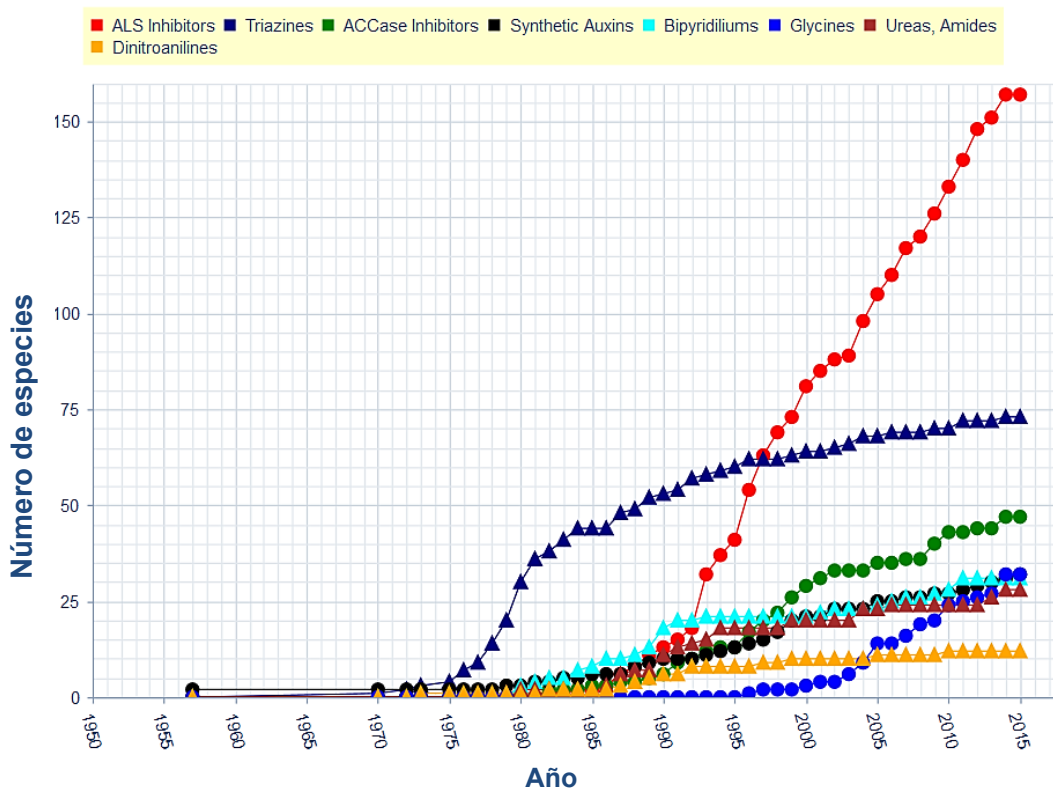
La resistencia a los herbicidas no es un problema que se presente en forma súbita en un terreno en particular, ni es la falta de control de malezas en un solo año. Puede ocurrir primero en una pequeña área o áreas, especialmente en donde se han utilizado herbicidas con el mismo modo de acción por varios 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 30](#) 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 30. 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 algodón, y son necesarios de dos a tres deshierbes, realizando cada uno después de los dos o tres primeros riegos de auxilio, suficientes para mantener el terreno libre de malezas durante el período crítico. Sin embargo, al presentarse especies perennes su eficiencia es limitada (Rosales y Sánchez, 2010).

El control manual se facilita en las siembras en surcos, camas o bordos y se sugiere realizarlo después del control mecánico, sobre todo cuando existen malezas como zacate Johnson o correhuela o bien si la población de maleza es baja y no se justifica la aplicación de herbicidas (Herrera *et al.*, 1988).

Control mecánico. El control mecánico de maleza en algodón se inicia con la preparación de la cama de siembra. La labranza primaria se realiza por medio de arado de discos, subsuelo o bordeadores y posteriormente, la labranza secundaria se efectúa con pasos de rastra.

El sistema de siembra en húmedo o a "tierra venida" elimina el primer flujo de emergencia de maleza y permite establecer el algodón en suelo "limpio". Posteriormente, el paso de escardas con cultivadora rotativa o de picos elimina a la maleza que emerge después de la siembra. El número y época de las escardas depende de factores tales como: presencia de maleza, humedad del suelo y disponibilidad de equipo (Rosales y Sánchez, 2010).

Estas prácticas contribuyen eficazmente en el control de la maleza presente en el terreno, hasta que la altura del cultivo permita el paso de maquinaria, con lo cual se resuelve el problema presente en las calles, sin embargo, el problema de la maleza que se desarrolla entre las hileras de plantas de algodón 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 30 se presentan los herbicidas recomendados para el control de maleza en el cultivo de algodón en México (PLM, 2014).

Cuadro 30. 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 |
| 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 GLTP (Cuadro 31).

Cuadro 31. 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 |

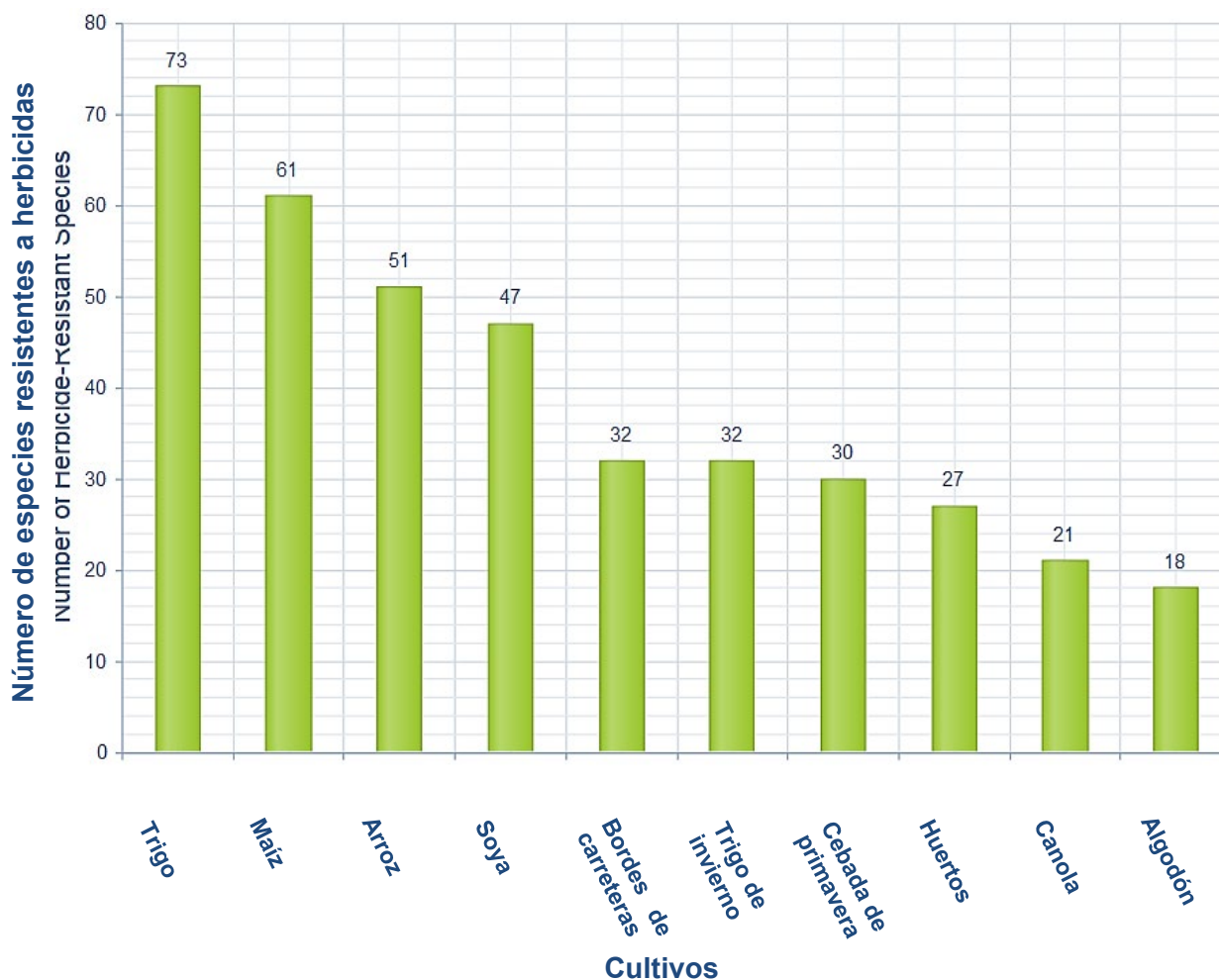
| | | |
|-------------|------------------|-------|
| Clethodim | Ciclohexanediona | 17 |
| Prometrina | Triazina | 15.37 |
| Glifosato | Glicinas | 15.33 |
| Fluometuron | Fenilurea | 14.27 |

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).

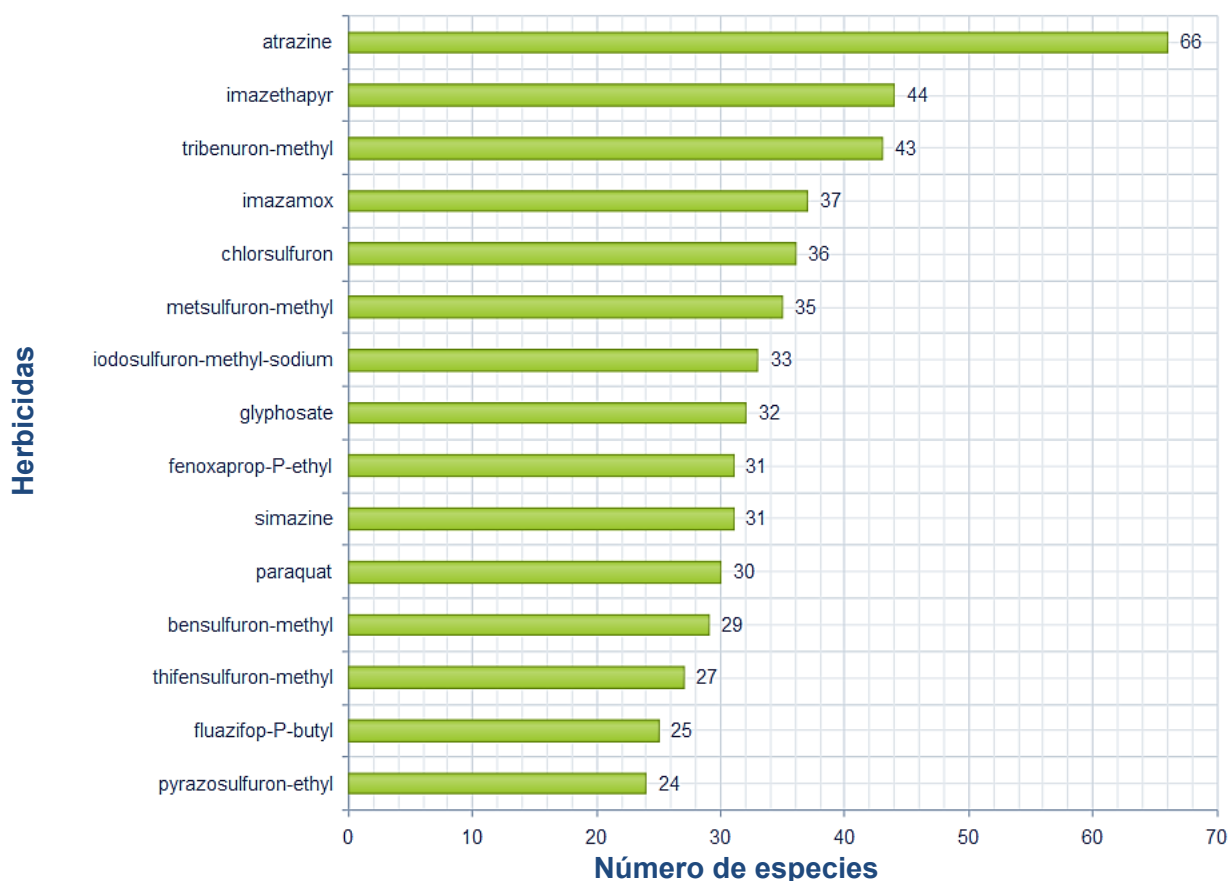
Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de resistencia es un fenómeno natural que no está restringido a los cultivos genéticamente modificados tolerantes a herbicidas. En la [Figura 31](#) puede observarse el número de especies resistentes a diferentes herbicidas de acuerdo al tipo de cultivo en los que se han utilizado.

Figura 31. Número de especies resistentes a herbicidas por cultivo (Heap, 2015).



En la [Figura 32](#) 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 32. 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 32](#)).

Cuadro 32. Ventajas y desventajas de los métodos de manejo de maleza.

| Método | Ventajas | Desventajas |
|--------|--|--|
| Manual | <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. • No controla las malezas, las poda. • Gran necesidad de mano de obra. • Rápida reinfestación (rebrotos vigorosos). |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Menor inversión inicial. | |

| Método | | Ventajas | Desventajas |
|----------|--------------------|---|---|
| Mecánico | Barbecho y Rastro | <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 puede observar en algodón desde inicio de cuadro hasta bellotas maduras. Las 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).

Cuadro 33. Muestreo y umbral económico de gusano bellotero y tabacalero en algodón.

| Método de muestreo | Umbral económico |
|--------------------------|--|
| Inspección de terminales | <p>Segunda semana de floración.</p> <ul style="list-style-type: none"> 100 terminales/20 ha 25 terminales por cuadrante o 20 terminales en cinco de oros. |
| Inspección de cuadros | <p>100 cuadros al azar por predio.</p> <ul style="list-style-type: none"> 25 cuadros por cuadrante o 20 por sitio en cinco de oros. |

| | | |
|---|--|---|
| Inspección de toda la planta en variedades biotecnológicas resistentes a insectos (Texas) | 100 plantas al azar por predio Frecuencia: 3 a 4 días | <ul style="list-style-type: none"> • 8 a 12 larvas >6 mm • 5 a 15% de cuadros y bellotas dañados |
|---|--|---|

Figura 33. Gusano bellotero (*Helicoverpa zea*).



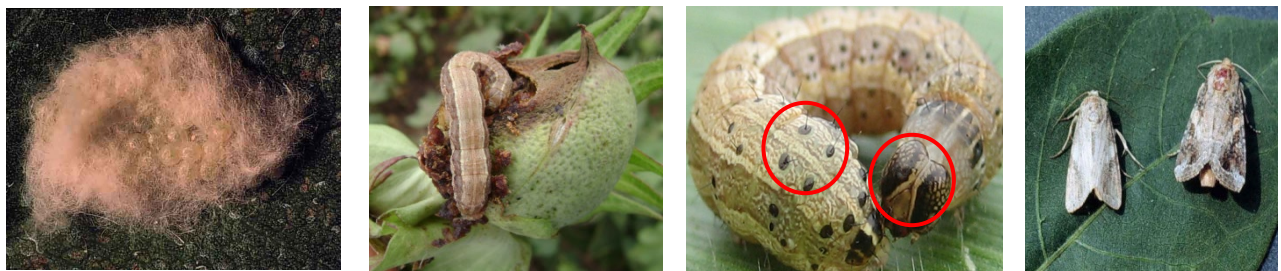
2. Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*).

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 presentan 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.

Cuadro 34. Muestreo y umbral económico de gusano cogollero en algodón.

| Muestreo | | Umbral económico |
|---|--|--|
| Inspección de 5 plantas en 10 sitios por predio | Buscar masas de huevecillos, larvas o daño en bellotas | <ul style="list-style-type: none"> • 4 o más larvas por 100 bellotas o flores |

Figura 34. 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 cuadreo, en ocasiones se llega a presentar durante la floración. Las hembras ponen sus huevos en masas cubiertas con escamas de la palomilla, las larvas son de color verde con líneas longitudinales de color claro amarillento y dos puntos negros en el segundo segmento torácico, emergen en forma gregaria y comienzan a dañar las hojas, posteriormente emigran a plantas cercanas, en plantas chicas dañan el follaje y en plantas grandes de algodón pueden encontrarse comiendo en las bellotas y perforando las bellotas.

Cuadro 35. Muestreo y umbral económico de gusano soldado en algodón.

| Muestreo | | Umbral económico |
|---|---|--|
| Inspección durante el período de primeros cuadros a primeros capullos | <ul style="list-style-type: none"> • 100 plantas al azar por predio • Muestreo de larvas mediante inspección de toda la planta. | Umbrales económicos (Texas) <ul style="list-style-type: none"> • Promedio de 2 masas de larvitas recién eclosionadas por 30 m • 40 larvas por 100 plantas |

Figura 35. 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 algodón, 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).

Cuadro 36. Muestreo y umbral económico de gusano rosado en algodón.

| Muestreo | | Umbral económico |
|---|---|--|
| Inicio: segunda semana de floración, cuando se observen las primeras bellotas susceptibles (15 a 30 días de edad) | Unidad de muestreo y tamaño de muestra: coleccionar 25 bellotas susceptibles al azar en cada uno de los cuadrantes del predio de un área no mayor de 40 hectáreas | • 10 – 12% de bellotas infestadas con larvas L1-L2 |

Figura 36. Gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*).



La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), mediante acuerdos publicados en el Diario Oficial de la Federación (DOF), ha establecido las siguientes zonas libres de gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) en México:

Cuadro 37. Acuerdos por los que se declaran zonas libres de gusano rosado en México.

| Fecha de publicación (DOF) | Acuerdo |
|----------------------------|--|
| 22 de noviembre de 2012 | Acuerdo por el que se declara zona libre de gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>) y picudo del algodonerero (<i>Anthonomus grandis</i>) a los municipios de Juárez, Práxedes G. Guerrero, Guadalupe, Ahumada, Janos, Ascensión, Nuevo Casas Grandes, Casas Grandes, Galeana y Buenaventura, en el estado de Chihuahua. |
| 8 de diciembre de 2014 | Acuerdo por el que se declara como zona libre de gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>) al Estado de Chihuahua, al Municipio de Sierra Mojada del Estado de Coahuila y a los municipios de Álamos, BÁCUM, Benito Juárez, Cajeme, Etchojoa, Huatabampo, Navojoa y San Ignacio Río Muerto del Estado de Sonora. |
| 3 de febrero de 2016 | Acuerdo por el que se declara como zona libre de Gusano Rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>) a los Estados de Baja California y Sonora |

5. Mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*).

La mosquita blanca es una plaga polífaga (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.

Cuadro 38. Muestreo y umbral económico de mosquita blanca en algodón.

| Muestreo | | Umbral económico |
|--|---|--|
| Muestreo mediante inspección de hojas | <p><u>Muestreo numérico.</u></p> <p>En este tipo de muestreo se cuentan los adultos presentes en cada unidad de muestreo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unidad de muestreo: la unidad de muestreo es el envés de una hoja tomada del quinto nudo. • Tamaño de muestra: se recomienda muestrear 30 a 50 hojas por predio. | <ul style="list-style-type: none"> • Aplicar insecticidas si hay 5 o más adultos/hoja |
| | <p><u>Muestreo binomial.</u></p> <p>En este tipo de muestreo se cuentan las hojas infestadas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestrear 30-50 hojas del quinto nudo | <ul style="list-style-type: none"> • 40% o más de hojas infestadas con al menos 3 adultos por hoja, lo cual corresponde a un umbral de 5 o más adultos/hoja |
| Monitoreo mediante trampas amarillas pegajosas | Colocar las colocan sobre una estaca a una altura aproximada de 10 a 15 cm sobre el nivel del suelo, se instalan semanalmente, se recogen a las 24 h y se cuentan las mosquitas capturadas con la ayuda de una lupa o un microscopio de disección | |

Figura 37. 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.

Cuadro 39. Muestreo y umbral económico del picudo del algodón.

| Muestreo | | Umbral económico |
|-----------------------|---|--|
| Inspección de cuadros | <ul style="list-style-type: none"> inspeccionar semanalmente 100 cuadros de por lo menos 1/3 de desarrollo al azar por predio colectar de al menos cuatro sitios representativos del predio y de varias partes de la planta | <ul style="list-style-type: none"> 6 % de cuadros dañados por alimentación y ovipostura |
| Inspección de flores | <ul style="list-style-type: none"> 100 flores al azar por cada 20 hectáreas | <ul style="list-style-type: none"> 5 adultos |

Figura 38. 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. 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.

Cuadro 40. Muestreo y umbral económico de la conchuela del algodón.

| Muestreo | | Umbral económico |
|--|--|---|
| Inspección de bellotas | <ul style="list-style-type: none"> • Colectar 25 bellotas susceptibles al azar en cada uno de los cuadrantes del predio de un área no mayor de 40 hectáreas | <ul style="list-style-type: none"> • Comarca Lagunera: $\geq 4\%$ de bellotas dañadas. • California (UC IPM): 20 - 25 adultos por 6 o 7 plantas inspeccionadas al azar. • Texas (TAMU): ≥ 1 chinche/2 m de plantas o 20% de bellotas dañadas. |
| Redeo | <ul style="list-style-type: none"> • 100 golpes de red por predio | |
| Muestreo de plantas y bellotas (Texas) | <ul style="list-style-type: none"> • Inspeccionar varias secciones de 2 m de plantas en diferentes sitios del predio y revisar al menos 50 bellotas. | |

Figura 39. 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 del cuadro, ocasionan la caída de los cuadrillos recién formados provocando un desarrollo excesivo de ramas y follaje; también causan la mala formación de bellotas, manchan la fibra, bajan el rendimiento y retrasan la cosecha. Este insecto también ataca otros cultivos como alfalfa y cártamo y cuando alcanza altas infestaciones, puede emigrar al algodón durante la etapa del cuadro, complicando así el manejo del cultivo (Herrera Andrade *et al.*, 2010).

Cuadro 41. Muestreo y umbral económico de la chinche lygus en algodón.

| Muestreo | | Umbral económico |
|---|--|--|
| Redeo (Valle de Mexicali, B.C. - San Luis Río Colorado, Son.) | <ul style="list-style-type: none"> • Durante el período crítico que inicia con la aparición de los primeros cuadros hasta las tres primeras semanas de producción de bellotas • Muestrear 2 veces por semana | <ul style="list-style-type: none"> • 15 chinches en 100 redadas |
| Redeo (Valle del Yaqui, Son.) | <ul style="list-style-type: none"> • Durante el período crítico que inicia con la aparición de los primeros cuadros hasta las tres primeras semanas de producción de bellotas • Muestrear 2 veces por semana | <ul style="list-style-type: none"> • 20 chinches (adultos y ninfas) por 100 redadas • El daño en cuadros no debe exceder del 25% |

Figura 40. 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 algodón. La principal forma de dispersión es el viento; la dirección y velocidad del viento tiene mucha influencia en las infestaciones en algodón.

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 41. Daño por trips en el cultivo del 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 alimentan 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 42. Pulgón del algodón (*Aphis gossypii*).



d) Algodón genéticamente modificado resistente a insectos.

B. thuringiensis es una bacteria que normalmente habita el suelo y durante el proceso de esporulación produce una inclusión de cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados especialmente larvas de insectos. Estas proteínas se llaman Cry y constituyen la base del insecticida biológico más difundido en el mundo (Sauka y Benintende, 2008).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño per se, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva (Bravo et al., 2004).

A través de la ingeniería genética se han desarrollado muchas especies de plantas que expresan genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* y comúnmente se hace referencia a este tipo de plantas como “plantas o cultivos Bt” (por ejemplo, maíz Bt, algodón Bt, etc.). El primer informe de una planta transgénica con un gen *cry* de *B. thuringiensis* data de 1987 (Vaek et al., 1987). Se desarrollaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que producían cantidades suficientes de proteína Cry para controlar larvas de primer estadio de *Manduca sexta*.

El algodón transgénico se sembró en México desde 1996 año en que se establecieron 896.8 ha en Tamaulipas, correspondiendo a un 0.3% de la superficie sembrada a nivel nacional (Martínez-Carrillo, 2004). Actualmente el algodón genéticamente modificado tolerante a herbicidas y resistente a insectos lepidópteros representa más del 90% del total nacional.

El algodón GLTP expresan las proteínas insecticidas Cry1Ab de *B. thuringiensis* subsp. Kurstaki, Cry2Ae de *B. thuringiensis* subsp. Dakota y VIP3A de *B. thuringiensis* cepa AB88, las cuales son específicas para el control de larvas de algunas especies de insectos lepidópteros de importancia económica en el cultivo del algodón. La expresión de tres proteínas insecticidas en una misma planta contribuye a reducir el riesgo de aparición de resistencia en las especies de plagas objetivo, ya que se reduce la probabilidad para que un insecto desarrolle simultáneamente un mecanismo de resistencia efectivo contra múltiples toxinas.

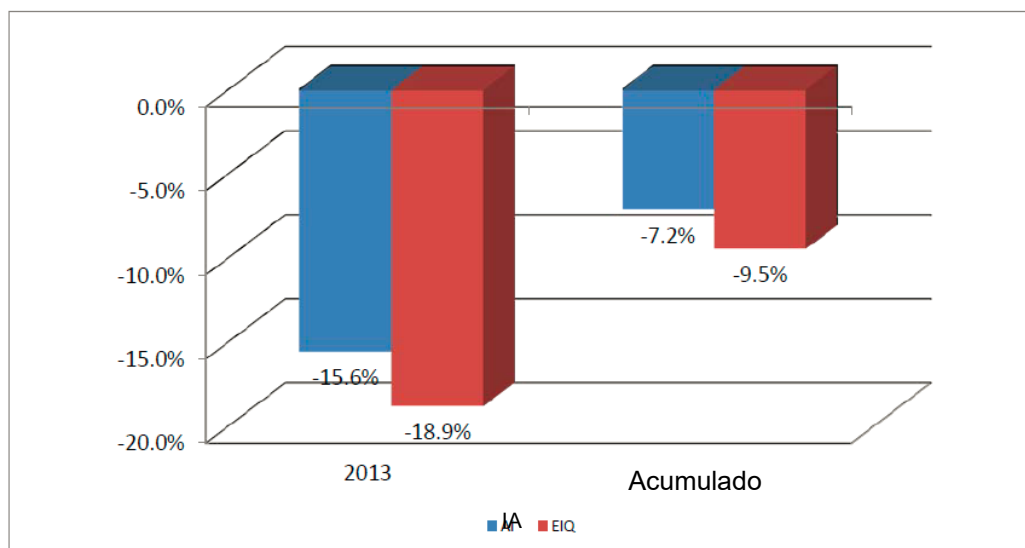
Con relación al manejo agronómico, la adopción de algodón biotecnológico resistente a insectos ha contribuido a la adopción de mejores prácticas agrícolas que han redundado en importantes beneficios económicos y ambientales (Brookes y Barfoot, 2012):

- Mayor espectro de control de insectos lepidópteros plaga.
- Aumento de rendimiento debido al control efectivo de las plagas blanco que atacan al cultivo.
- Reducción significativa en el uso de insecticidas químicos (Figura 43).
- Disminución de la contaminación del suelo y mantos freáticos al utilizar insecticidas con menor impacto ambiental (Cuadro 42).
- Menor impacto en las poblaciones de insectos benéficos y otros organismos no blanco, debido a su especificidad y a que los únicos insectos expuestos a las toxinas son aquellos que se alimentan de los cultivos.
- Compatibilidad con prácticas de manejo integrado de plagas (MIP).
- Reducción de la emisión de gases de efecto invernadero (disminución en el uso de combustibles necesarios para la fabricación, transporte y aplicación de insecticidas).

Desde 1996, el impacto neto en el uso de insecticidas y la huella ambiental (en relación con lo que podría haberse esperado, si todas las plantaciones de algodón se hubieran sembrado con algodón convencional), en los principales países que han adoptado algodón resistente a insectos ha sido:

- En 2013, una disminución de 44.3% en el volumen total de I.A. insecticida aplicado (20.6 millones de kg) y una reducción de 48.2% en el impacto ambiental (medido en términos de EIQ/ha).
- Desde 1996, se ha usado un 26.6% menos de I.A. insecticida (227.5 millones de kg) y el impacto ambiental debido a la aplicación de insecticidas en algodón se redujo un 29.4%.

Figura 43. 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 42. 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 |
| Quisalofop-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

e) Resistencia de insectos.

La resistencia es una característica de fundamento genético que permite a un organismo sobrevivir a la exposición con una dosis de un plaguicida que normalmente podría resultar letal. Los genes de resistencia ocurren naturalmente en plagas individuales debido a mutaciones genéticas y de carácter hereditario. Los genes se diseminan a través de las poblaciones de plagas debido a un proceso de selección provocado por el uso repetido del plaguicida. Las poblaciones resistentes se desarrollan debido a que los individuos resistentes sobreviven y se reproducen posteriormente, y el rasgo de resistencia es “seleccionado” en la siguiente generación, mientras que los individuos susceptibles son eliminados por el tratamiento plaguicida. Si se continúa con el tratamiento, el porcentaje de sobrevivientes aumentará y la susceptibilidad de la población declinará hasta un punto que el plaguicida no podrá más proporcionar un nivel aceptable de control (FAO, 2012).

A lo largo del último siglo, cientos de especies de insectos han desarrollado resistencia a una o más medidas de control, impactando severamente en la economía de la producción de los cultivos (

Cuadro 43). La mayoría de los casos de resistencia de insectos hasta la fecha involucra insecticidas químicos sintéticos (Yu, 2008), pero también se ha desarrollado resistencia a algunos agentes microbianos, tales como las formulaciones para aspersión de Bt (Ferré and Van Rie, 2002).

Cuadro 43. Los 20 artrópodos más importantes, para los cuales se han registrado casos de resistencia en la agricultura y la salud pública.

| Orden | Familia | Especies | Rango de hospedantes | Hospedante |
|-------------|---------------|----------------------------------|----------------------|---|
| Acari | Acaridae | <i>Rhizoglyphus robini</i> | 19 | Plantas ornamentales, cebolla almacenada |
| Acari | Ixodidae | <i>Boophilus microplus</i> | 6 | Ganado bovino |
| Acari | Tetranychidae | <i>Panonychus ulmi</i> | 9 | Árboles frutales |
| Acari | Tetranychidae | <i>Tetranychus urticae</i> | 1 | Algodón, flores, frutales, hortalizas |
| Coleoptera | Chrysomelidae | <i>Leptinotarsa decemlineata</i> | 4 | Papa, berenjena, tomate |
| Coleoptera | Tenebrionidae | <i>Tribolium castaneum</i> | 17 | Granos almacenados, cacahuate, sorgo |
| Dermaptera | Blattellidae | <i>Blattella germanica</i> | 7 | Urbano |
| Diptera | Calliphoridae | <i>Lucilia cuprina</i> | 18 | Ganado bovino y ovino |
| Diptera | Culicidae | <i>Anopheles albimanus</i> | 20 | Humano |
| Diptera | Culicidae | <i>Culex pipiens pipiens</i> | 11 | Humano |
| Diptera | Culicidae | <i>Culex quinquefasciatus</i> | 15 | Humano |
| Diptera | Muscidae | <i>Musca domestica</i> | 5 | Urbano |
| Hemiptera | Aleyrodidae | <i>Bemisia tabaci</i> | 8 | Algodón, cucurbitáceas, crucíferas y hortalizas |
| Hemiptera | Aphididae | <i>Aphis gossypii</i> | 10 | Algodón, hortalizas |
| Hemiptera | Aphididae | <i>Myzus persicae</i> | 3 | Frutales, hortalizas, árboles |
| Hemiptera | Aphididae | <i>Phorodon humuli</i> | 12 | Lúpulo, ciruela |
| Lepidoptera | Noctuidae | <i>Helicoverpa armigera</i> | 13 | Algodón, maíz, tomate |
| Lepidoptera | Noctuidae | <i>Heliothis virescens</i> | 14 | Garbanzo, algodón, maíz, tomate |
| Lepidoptera | Noctuidae | <i>Spodoptera littoralis</i> | 16 | Alfalfa, algodón, papa, hortalizas |
| Lepidoptera | Noctuidae | <i>Plutella xylostella</i> | 2 | Crucíferas |

Fuente: Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State University. Disponible en: <http://www.pesticideresistance.org/search.php>

La resistencia de insectos a proteínas insecticidas no es específica de los cultivos Bt. La aspersión de insecticidas formulados a base de Bt en una amplia variedad de cultivos, presenta un riesgo equivalente o mayor de desarrollo de resistencia debido a las altas dosis y al uso irracional de estos productos (Roush, 1994).

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

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

Los estudios científicos indican que los alelos para un alto nivel de resistencia a las proteínas Bt son básicamente recesivos (Gould *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Tabashnik, 1994; Tabashnik *et al.*, 2000). Por lo tanto, para que un insecto sea totalmente resistente a Bt, debe ser homocigoto para el alelo de resistencia y se ha observado que la frecuencia de alelos de resistencia es relativamente baja en las poblaciones de insectos (EPA, 2001).

La resistencia puede y ha evolucionado a todas las formas de manejo de plagas, incluyendo las herramientas químicas, biológicas y culturales, y no es una preocupación única a los cultivos GM. Sin embargo, los beneficios de las características GM de protección contra insectos se consideran tan valiosas que los proveedores de la tecnología y otros actores involucrados han puesto especial énfasis en prolongar su durabilidad retrasando la tasa de desarrollo de la resistencia en los insectos blanco. Se dispone de múltiples tácticas para preservar la durabilidad de las tecnologías de manejo de insectos, incluyendo el uso de la tecnología solo contra las poblaciones de plagas económicamente más dañinas, alternando entre diferentes tácticas de control, o integrando múltiples tácticas en un programa de manejo de plagas (CropLife, 2012).

El objetivo del manejo de la resistencia es retrasar la evolución de la resistencia en las poblaciones de la plaga expuestas a la herramienta de control, por lo que el plan de manejo de resistencia (MRI) deberá constituirse con las técnicas disponibles (CropLife, 2012):

- Alta dosis/refugio
- Monitoreo de los predios y aplicación de insecticidas acorde a las necesidades.
- Rotación de insecticidas con diferente modo de acción.
- Uso de medidas de control suplementarias que otorguen un manejo adicional de plagas.
- Combinación dentro de una planta múltiples eventos que tengan como blanco las mismas plagas (pyramiding).
- Establecimiento de la línea base y monitoreo de susceptibilidad.
- Destrucción de los residuos de cosecha.

f) Alternativas al uso de algodón GM resistente a insectos.

El control de plagas en el cultivo de algodón se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro (Cuadro 44), 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 44. 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 | Piretoride |
| Bifentrina | EC 12.15% (100 g/L) | 40 - 60 | Ligeramente tóxico | Piretroide |
| Carbaril | WP 80% (800 g/kg) | 1,200 - 2,400 | Moderadamente tóxico | Carbamato |
| Cipermetrina | EC 19.6% (200 g/L) | 80 - 120 | Moderadamente tóxico | Piretroide |

| Ingrediente activo | Formulación ^a | Dosis (g i.a./ha) | Categoría Toxicológica | Grupo Químico |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------|--|
| 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 cyaotrina | EC 5 % (50 g/L) | 20 - 30 | Ligeramente tóxico | Piretroide |
| Malation | EC 83.7% (100 g/L) | 70 - 200 | Ligeramente tóxico | Organofosforado |
| Metidation | EC 40% (415 g/L) | 415 - 830 | Altamente tóxico | Organofosforado |
| Metomilo | SP 90% (900 g/kg) | 225 - 360 | Altamente tóxico | Carbamato |
| Monocrotofos | Líquido miscible 56% (600 g/L) | 300 - 900 | Extremadamente tóxico | Organofosforado |
| Paratión metílico | EC 47.4% (500 g/L) | 500 - 1,500 | Extremadamente tóxico | Organofosforado |
| Permetrina | EC 33.66% (340 g/L) | 136 - 204 | Moderadamente tóxico | Piretroide |
| Profenofos | EC 73.56% (960 g/L) | 576 - 1152 | Moderadamente tóxico | Organofosforado |
| Spinosad | SC 44.2% (480 g/L) | 36 - 60 | Ligeramente tóxico | Derivado de fermentación bacteriana (Naturalyte) |
| Thiodicarb | SC acuosa 33.7% (375 g/L) | 562.5 - 1125 | Moderadamente tóxico | Carbamato |
| Triazofos | EC 40.0% (420 g/L) | 630 | Altamente tóxico | Organofosforado |

^a SL: concentrado soluble; WP: polvo humectable; SC: suspensión concentrada; SP: polvo soluble; EC: concentrado emulsionable; P: pellets.

En México, antes de la década de los 60's, al algodón se le conocía como el oro blanco debido a que ocupaba una gran cantidad de mano de obra y representaba una fuente de ingresos importante para los agricultores. En la década de los 60's, solamente en el estado de Tamaulipas se sembraban 630, ha (Vargas *et al.*, 1979). Desafortunadamente, el combate de las plagas de este cultivo se sustentó en aplicaciones calendarizadas de insecticidas, aumentos frecuentes en las dosis y en el número de aplicaciones por temporada; a principios de la década de los 70's, en el cultivo de algodón se aplicaba el 80% de todos los insecticidas que se empleaban en la agricultura mexicana. Este escenario favoreció el desarrollo de resistencia a insecticidas y por ende que este cultivo entrará en fase de crisis a nivel nacional (Lagunes 1992).

En las décadas de los 60's y 70's, la resistencia a insecticidas de varias plagas de insectos provocaron la desaparición de las zonas algodonerías de Apatzingán, Michoacán, Tapachula, Chiapas y Matamoros, Tamaulipas (Lagunes, 1992). La zona de Tamaulipas se recuperó lentamente para sufrir otra crisis debido a la resistencia a insecticidas piretroides en el gusano tabacalero *Heliothis virescens* (Fabricius) a mediados de la década de los 90's (Terán-Vargas, 1996).

Dentro de un escenario de elevados niveles de resistencia a insecticidas convencionales, la introducción del algodón transgénico, que expresa la δ -endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki Berliner (Bt) (Perlak *et al.*, 1990, 1991) representó una alternativa viable para cultivar algodón (Terán-Vargas *et al.*, 2005). Posteriormente se introdujo el algodón que expresaba dos proteínas Bt (Cry1Ac y Cry2Ab) que contribuyó a mejorar el control de los lepidópteros plaga del cultivo y a retrasar el desarrollo de resistencia.

g) Literatura consultada.

La literatura no confidencial se encuentra dentro del texto.

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

El algodón GLTP (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7) es exclusivamente para uso agrícola.

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

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

Se solicita el permiso para el ciclo agrícola PV-2020. Este periodo incluye actividades previas a la siembra del algodón GLTP (BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7) tales como planeación de los estudios a realizar e importación de la semilla, el ciclo agrícola hasta la finalización del ensayo.

INFORMACIÓN ADICIONAL.

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

La cantidad de semilla a importar para la operación del permiso es la solicitada y estará sujeta a la cantidad autorizada al final de la evaluación para este permiso 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** (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** (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** (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 SAP⁵⁸.
- 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 BASF 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** (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** (confidencial).

- Después de que las 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.

⁵⁸ 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.

- La identificación de las semillas deberá tener como mínimo los siguientes datos, dependiendo del tipo de semilla genéticamente modificada o convencional (**Figura 44**).
- 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 44. Información que deben contener las etiquetas para la identificación de los materiales experimentales.



2. Movilización de la semilla.

La semilla saldrá del almacén sólo cuando BASF 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** (confidencial).

Una vez que la semilla sea entregada al investigador responsable con quien BASF 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, BASF Mexicana 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 los 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 llevará a cabo durante la liberación en etapa experimental.

El diseño experimental para la evaluación agronómica y ambiental del algodón GlyTol® TwinLink® Plus (GLTP), se encuentra dentro del protocolo propuesto para la liberación en etapa experimental en las zonas agrícolas de Chihuahua, Coahuila y Durango, durante el ciclo agrícola PV-2020. (confidencial).

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 45). 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 45).

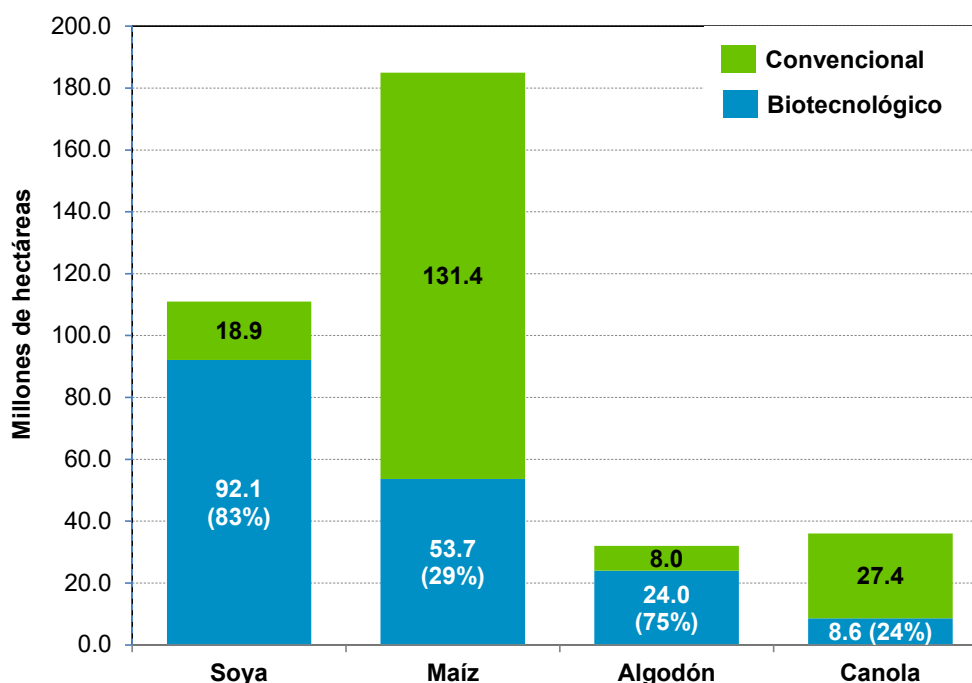
Cuadro 45. Superficie sembrada con cultivos biotecnológicos por país durante 2015.

| 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 |

| País | Superficie sembrada (millones de hectáreas) | Cultivos |
|-----------------|---|--------------------|
| 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 45. Adopción global de los principales cultivos biotecnológicos durante 2015.



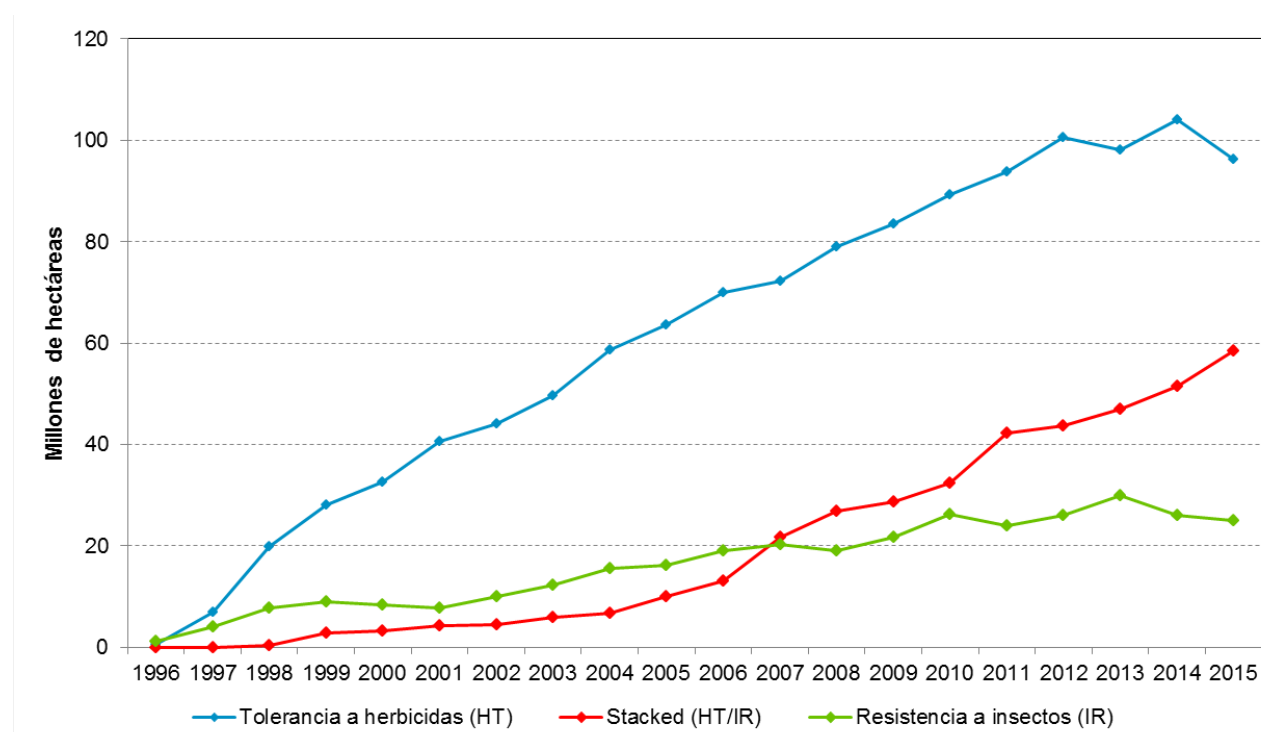
Fuente: James, C. 2015. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

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 46](#)).

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, economías 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 46. 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.

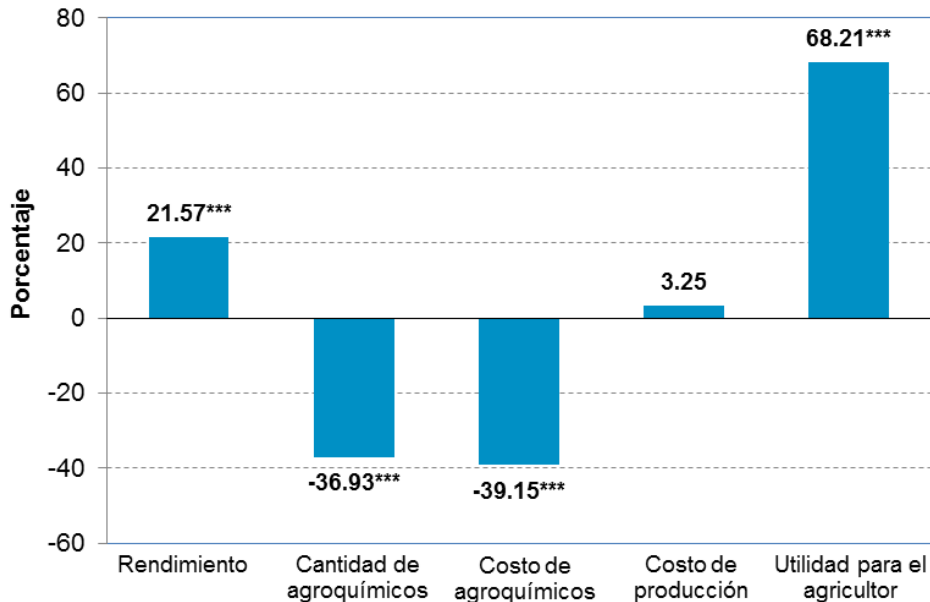
En México también se cuenta con una experiencia acumulada durante los últimos 20 años de siembra de algodón biotecnológico a nivel experimental, piloto y comercial, con las características de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos lepidópteros. Durante este periodo se ha realizado una gran 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.

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 soya, 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 47).

Figura 47. 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.

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.

El impacto económico que ha tenido la adopción de cultivos biotecnológicos ha sido objeto de múltiples estudios. Brookes y Barfoot (2014)⁵⁹ han examinado el impacto económico anual en el rendimiento, costos de producción, utilidad para los agricultores y productividad para los cultivos de soya, maíz, algodón y canola desde 1996. El beneficio económico acumulado para los agricultores durante un periodo de 17 años (1996 - 2012) fue de 116.6 mil millones de dólares, así mismo, estas tecnologías han tenido una importante contribución en el aumento de la producción de soya, maíz, algodón y canola, incrementándose de 122 millones en 1996 a 230 millones de toneladas en 2012.

El primer cultivo genéticamente modificado que se sembró a nivel comercial fue un tomate en 1994; sin embargo, 1996 fue el primer año en el que se presentó un incremento significativo en la superficie sembrada de estos cultivos (1.66 millones de hectáreas). A partir de ese año la siembra de cultivo biotecnológicos se ha incrementado de manera significativa alcanzando 160 millones de hectáreas en 2012 (Brookes & Barfoot, 2014). Los beneficios económicos han estado relacionados principalmente con el ahorro en costos y ganancia en rendimiento ([Cuadro 47 - 50](#)).

⁵⁹ Brookes, G.; Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops. The global income and production effects 1996–2012. GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 5:1, 65–75. Landes Bioscience. PG Economics Ltd; Dorchester, UK.

Cuadro 46. Algodón tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea).

| País | Costo de tecnología | Ingreso promedio (restando el costo de la tecnología) | Tipo de beneficio |
|----------------|---------------------|---|--|
| Argentina | 17 - 30 | 40 | Ahorro en costo |
| Australia | 32 - 131 | 30 | Ahorro en costo |
| Brasil | 37 - 52 | 91 | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 2 a 4% |
| Colombia | 96 - 187 | 101 | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 4% |
| Estados Unidos | 13 - 82 | 22 | Ahorro en costo |
| México | 29 - 72 | 177 | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 3 a 18% |
| Sudáfrica | 15 - 32 | 33 | Ahorro en costo |

^a El costo de la tecnología está relacionado con el precio establecido por la compañías, tasas de cambio, densidad de siembra (kg de semilla/ha), naturaleza y efectividad de la tecnología, etc.

Fuente: Brookes, G.; Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops. The global income and production effects 1996 – 2012. GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 5:1, 65–75. Landes Bioscience. PG Economics Ltd; Dorchester, UK

Cuadro 47. Soya tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea).

| País | Costo de tecnología ^a | Ingreso promedio (restando el costo de la tecnología) | Tipo de beneficio |
|---|----------------------------------|---|--|
| Primera generación de soya tolerante a herbicida | | | |
| Argentina | 2 - 4 | \$22 más un segundo cultivo; beneficio total \$213 | Ahorro en costo más un segundo cultivo en el año |
| Brasil | 11 - 25 | 34 | Ahorro en costo |
| Canadá | 20 - 40 | 20 | Ahorro en costo |
| Estados Unidos | 15 - 39 | 38 | Ahorro en costo |
| México | 20 - 25 | 48 | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 2 a 13% |
| Sudáfrica | 20 - 30 | 4 | Ahorro en costo |
| Segunda generación de soya tolerante a herbicida | | | |
| Estados Unidos y Canadá | 47 - 65 | 149 (Estados Unidos) 129 (Canadá) | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 5 a 11% |

^a El costo de la tecnología está relacionado con el precio establecido por la compañía, tasas de cambio, densidad de siembra (kg de semilla/ha), naturaleza y efectividad de la tecnología, etc.

Fuente: Brookes, G.; Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops. The global income and production effects 1996 – 2012. GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 5:1, 65–75. Landes Bioscience. PG Economics Ltd; Dorchester, UK.

Cuadro 48. Maíz tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea).

| País | Costo de tecnología | Ingreso promedio (restando el costo de la tecnología) | Tipo de beneficio |
|----------------|---------------------|---|--|
| Argentina | 16 - 20 | 90 | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 10% |
| Brasil | 17 - 32 | 58 | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 1 a 7% |
| Canadá | 17 - 35 | 11 | Ahorro en costo |
| Colombia | 22 - 24 | 17 | Ahorro en costo |
| Estados Unidos | 15 - 30 | 21 | Ahorro en costo |
| Filipinas | 24 - 47 | 40 | Ahorro en costo más ganancia en rendimiento de 5 a 15% |
| Sudáfrica | 10 - 18 | 1 | Ahorro en costo |

^a El costo de la tecnología está relacionado con el precio establecido por las compañías, tasas de cambio, densidad de siembra (kg de semilla/ha), naturaleza y efectividad de la tecnología, etc.

Fuente: Brookes, G.; Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops. The global income and production effects 1996 – 2012. GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 5:1, 65–75. Landes Bioscience. PG Economics Ltd; Dorchester, UK

Cuadro 49. Canola tolerante a herbicida. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea).

| País | Costo de tecnología | Ingreso promedio (restando el costo de la tecnología) | Tipo de beneficio |
|----------------|---------------------|---|-------------------------------------|
| Australia | 22 - 41 | 55 | Ganancia en rendimiento de 12 a 22% |
| Canadá | 18 - 32 | 51 | Ganancia en rendimiento de 3 a 12% |
| Estados Unidos | 12 - 33 | 52 | Ganancia en rendimiento de 1 a 12% |

^a El costo de la tecnología está relacionado con el precio establecido por las compañías, tasas de cambio, densidad de siembra (kg de semilla/ha), naturaleza y efectividad de la tecnología, etc.

Fuente: Brookes, G.; Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops. The global income and production effects 1996 – 2012. GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 5:1, 65–75. Landes Bioscience. PG Economics Ltd; Dorchester, UK.

Cuadro 50. Cultivos resistentes a insectos. Beneficio económico para los agricultores durante el periodo 1996 - 2012 (USD\$/hectárea).

| País | Maíz resistente a insectos (costo de tecnología) ^a | Maíz resistente a insectos Ingreso promedio (restando el costo de la tecnología) | Algodón resistente a insectos (costo de tecnología) ^a | Algodón resistente a insectos Ingreso promedio (restando el costo de la tecnología) |
|----------------|---|--|--|---|
| Estados Unidos | 17 - 32 (barrenador de tallo) 22 - 42 (gusano de la raíz) | 87 (barrenador de tallo) 89 (gusano de la raíz) | 26 - 58 | 107 |

| | | | | |
|-----------------|--|---|----------|------------|
| Canadá | 17 - 25 (barrenador de tallo) 22 - 42 (gusano de la raíz) | 89 (barrenador de tallo) 106 (gusano de la raíz) | N/A | N/A |
| Argentina | 20 - 33 | 19 | 26 - 86 | 191 |
| Filipinas | 30 - 47 | 94 | N/A | N/A |
| Sudáfrica | 8 - 17 | 80 | 14 - 50 | 192 |
| España | 17 - 51 | 214 | N/A | N/A |
| Uruguay | 20 - 33 | 26 | N/A | N/A |
| Honduras | 100 | 61 | N/A | N/A |
| Colombia | 43 - 49 | 247 | 50 - 175 | 67 |
| Brasil | 54 - 69 | 83 | 34 - 52 | 8 |
| China | N/A | N/A | 38 - 60 | 361 |
| Australia | N/A | N/A | 85 - 299 | 211 |
| México | N/A | N/A | 48 - 70 | 182 |
| India | N/A | N/A | 15 - 54 | 252 |
| Burkina Faso | N/A | N/A | 51 - 54 | 201 |
| Burma | N/A | N/A | 17 - 20 | 176 |
| Pakistan | N/A | N/A | 4 - 15 | 77 |
| Promedio | | 81 | | 230 |

^a El costo de la tecnología está relacionado con el precio establecido por la compañías, tasas de cambio, densidad de siembra (kg de semilla/ha), naturaleza y efectividad de la tecnología, etc.

Fuente: Brookes, G.; Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops. The global income and production effects 1996 – 2012. GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 5:1, 65–75. Landes Bioscience. PG Economics Ltd; Dorchester, UK.

3. Beneficio ambiental.

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 & 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.