

Caso de estudio: solicitud de permiso para la Liberación al Medio Ambiente de Algodón Genéticamente Modificado. (CASO FICTICIO CON PROPÓSITOS DE CAPACITACIÓN)



ACLARACIÓN:

La información y datos aquí presentados han sido generados o extraídos de diferentes fuentes de información pública, para crear un caso de estudio hipotético, ilustrativo y no necesariamente con información exhaustiva, con propósitos de capacitación para los participantes del taller.

Resumen de la Solicitud	
Denominación del evento:	AGS001-1
Nombre científico del organismo receptor:	<i>Gossypium hirsutum</i> L.
Nombre común:	Algodón, algodnero
Elementos génicos y productos de expresión:	Gen CP4 EPSPS de <i>Agrobacterium</i> sp. cepa CP4: confiere tolerancia al herbicida glifosato al ser una enzima involucrada en la penúltima fase de la ruta bioquímica del shikimato para la producción de aminoácidos aromáticos en los cloroplastos. Genes Cry1Ac y Cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> : aportan resistencia a insectos lepidópteros mediante acción tóxica selectiva en el intestino de insectos blanco.
Fenotipo aportado:	Tolerancia al herbicida glifosato y resistencia a insectos lepidópteros como gusano rosado (<i>Pectinophora gossypiella</i>) y gusano tabacalero (<i>Heliothis virescens</i>).

Método de transformación:	Cruza convencional a partir de los eventos MON 15985 (algodón Bollgard®II) y MON 88913 (algodón Solución Faena Flex®).
Sitios propuestos de liberación:	Regiones agrícolas de Chihuahua y la Comarca que comprende los estados de Coahuila y Durango.
Uso previsto:	Cultivo de algodón para su aprovechamiento en la industria textil y el procesamiento de alimentos de acuerdo al uso del algodón convencional.

1. Introducción

El algodón es un cultivo de gran importancia a nivel mundial. No solo es relevante económicamente en el comercio internacional, sino que también se usa para vestir a una parte sustancial de la población. Dicho cultivo cuenta con una gran capacidad utilitaria además de prendas de vestir y objetos domésticos, el algodón se usa en productos industriales como filtros para acondicionadores de aire, balsas salvavidas, cintas transportadoras, carpas, neumáticos de automóvil, piscinas, cascos de seguridad o ventiladores de mina). Como fibra natural y fuente de alimento, el algodón es un recurso agrícola renovable, que puede ayudar a mantener su competitividad con fibras sintéticas desde un punto de vista ambiental y ecológico (Percival y Kohel, 1990). Además, más del 90% de la producción mundial de algodón se extiende por los hemisferios Norte y Sur a latitudes subtropicales y templadas, donde dicha producción fue de 22.93 millones de toneladas para el ciclo 2016/17 en 32.3 millones de hectáreas (CCIA, 2018).

El algodón es único entre las plantas cultivadas, ya que cuatro especies han sido domesticadas de forma independiente en distintas regiones del mundo: dos tetraploides: *Gossypium hirsutum* L. en Mesoamérica y *G. barbadense* L. en América del Sur; y dos diploides: *G. herbaceum* L. en Arabia y Siria y *G. arboreum* L. en el valle del Indo de India y Pakistán (Wendel *et al.* 2010). En el proceso, se transformaron de arbustos erectos perennes o arbustos erectos sensibles, en plantas cortas, compactas y anuales de longitud de día neutral. Sus pequeñas semillas impermeables, escasamente cubiertas por pelos bien diferenciados, se volvieron más grandes y se cubrieron de pelusa blanca abundante y larga. Simultáneamente, sus semillas perdieron su impermeabilidad y latencia. La gran diversidad de algodón resulta de las sucesivas oleadas de mejora agronómica y difusión de germoplasma mediadas por humanos (Brubaker *et al.* 1999).

El algodón es un cultivo comercial primordial para muchas economías en desarrollo, pues respalda los medios de subsistencia de millones de hogares. En algunos países, contribuye en altas cifras (como el 40 por ciento) de las exportaciones de mercancías y en más del 5 por ciento del PIB (Baffes, 2005). Es por ello que es fundamental mantener un buen estado de los cultivos para la garantía de las cosechas.

Dado que el algodón es poco tolerante a la sal y a la sequía, es un cultivo muy atractivo para las regiones áridas y semiáridas del mundo. Asimismo, los recursos hídricos sufren una disminución en todo el mundo, por lo que las economías que dependen de este cultivo se enfrentan a dificultades y conflictos, así como a posibles problemas ambientales (Chapagain *et al.* 2006). Las fluctuaciones en la producción de algodón, incluso dentro de un mismo país, son importantes. Las causas de estas variaciones suelen deberse a condiciones ambientales tanto bióticas como abióticas, como son la existencia de parásitos o las precipitaciones, y a condiciones económicas, como los costos de producción y la competencia de las fibras sintéticas. A pesar de ello, el

algodón sigue siendo una materia prima importantísima para la industria textil. En este sentido, el uso de algodón genéticamente modificado se ha dado en varios países productores, con eventos de resistencia a insectos plaga para protección del cultivo, buscando un control de plagas más eficaz y, en consecuencia, una mejora del rendimiento y una reducción en los costos de producción; lo que de acuerdo a algunos autores ha resultado en una mejora de la rentabilidad para los productores de algodón (Edge *et al.* 2001).

2. Referencia sobre origen y diversificación del organismo receptor

El género del algodón (*Gossypium*), incluye aproximadamente 52 especies distribuidas en regiones áridas y semiáridas de los trópicos y subtropicos (Ulloa *et al.* 2006). Las especies de este género presentan una gran variedad morfológica, citogenética y genómica, dada como consecuencia de la radiación global del género, que llevó a la evolución de ocho grupos de especies diploides (genomas A-G y K).

La historia evolutiva del género incluye eventos consecutivos de dispersiones trans-oceánicas, invasión de nuevos nichos ecológicos, y una frecuencia sorprendentemente alta de hibridación entre los linajes. Los datos indican que el origen de *Gossypium* se remonta a hace 10-15 millones de años y que tuvo una diversificación temprana rápida de la mayoría de los grupos genómicos (Wendel *et al.* 2003).

Existen cuatro linajes dentro del género, presentes en tres continentes: Australia (los del genoma C, G y K), América (genoma D) y África-Arabia (los del genoma A, B, F y E). Dentro de los americanos hay 13 especies, cuyo centro de diversidad es México (Wendel *et al.* 2003), por lo que se sugiere que en esta región se haya originado y diversificado la sección del genoma-D del género (Wendel *et al.* 2003). Las especies diploides del género *Gossypium* del Nuevo Mundo, comprenden un ensamble monofilético y citogenético, conocido taxonómicamente como el subgénero *Houzingenia*. Este grupo incluye 11 especies distribuidas en México, una en Perú y otra en las Islas Galápagos. Dentro de este grupo podemos encontrar a uno de los linajes parentales del algodón alotetraploide del algodón cultivado: *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* (Álvarez *et al.*, 2005).

La historia evolutiva del género *Gossypium*, sugiere que los algodones alotetraploides ($2n=4x=52$) se originaron hace aproximadamente 1.5 millones de años, luego de la divergencia de los progenitores diploides. *Gossypium hirsutum*, cuyo genoma es AD, es uno de los algodones tetraploides de mayor importancia en México y el mundo. Entre las especies existentes, *G. herbaceum* y *G. arboreum* son los parientes más cercanos al progenitor del genoma-A, mientras que *G. raimondii* es el mejor modelo como progenitor parental del genoma-D (Liu *et al.*, 2001). Sin embargo, ha habido opiniones opuestas respecto a la especie donadora del genoma-D en el caso de las alotetraploides, ya que, aunque la mayoría de las evidencias apoyan la hipótesis de que la especie parental es *G. raimondii*, hay otras que sugieren que podría ser la especie *G. gossypoides*, endémica actualmente del estado de Oaxaca en México (Liu *et al.*, 2001).

Las especies alotetraploides contienen la combinación de los genomas AADD y tienen 26 cromosomas largos y 26 cromosomas cortos, aunque existe algún traslape en el 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 anfidiplóide (AADD, $2n=4x=52$) produjo

híbridos fértiles cuando fue cruzado con especies tetraploides americanas. Dos especies diploides y dos tetraploides de *Gossypium* son las especies cultivadas actualmente:

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

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

3. Especies relacionadas con el OVM y su distribución

Las investigaciones filogenéticas en *Gossypium* distinguen a 45 especies diploides modernas distribuidas entre tres linajes geográficos principales y ocho genomas. El linaje tetraploide estadounidense se originó en los últimos 1-2 millones de años a partir de un único evento de hibridación entre un genoma A materno africano y un genoma D americano (Wendel *et al.* 2010). Se diversificó en cinco especies, tres especies silvestres endémicas, *G. darwinii* Watt nativa de Galápagos, *G. tomentosum* Nutt. ex Seem. de las islas hawaianas, *G. mustelinum* Miers ex Watt restringido al noreste de Brasil, y las dos especies cultivadas *G. barbadense* y *G. hirsutum*. Este último proporciona más del 90% del algodón mundial, extendiéndose al norte y al sur a latitudes subtropicales y templadas, más de 30 ° como cultivo anual. Su rango indígena (preindustrial) abarca la mayor parte de Mesoamérica y el Caribe, con dos centros de diversidad morfológica y genética: uno en el sur de México-Guatemala, considerado un centro primario de diversidad, y otro en el Caribe, donde se realizó cierta introgresión con *G. Barbadense* (d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014).

En estas dos regiones, *G. hirsutum* exhibe una gran variedad de formas perennes, que Hutchinson (1951) clasificó en siete razas geográficas. La raza primitiva y altamente variable 'punctatum' se encuentra principalmente en Yucatán y alrededor de las costas e islas del Golfo de México. La raza 'latifolium' tiene un centro de diversidad en Guatemala y el sur de México, pero su rango abarca desde la mayor parte de México hasta El Salvador y Nicaragua. La raza 'Marie-Galante' es distinta geográficamente y morfológicamente, con su pronunciada dominancia apical y hábito arbóreo. Su rango incluye las Antillas y América Central, al sur de El Salvador al norte y noreste de América del Sur. Su origen y difusión parecen estar estrechamente relacionados con las migraciones humanas que habrían resultado en la introducción de *G. barbadense* en Centroamérica y las Antillas y su introgresión con *G. hirsutum* en estas áreas. En conjunto, estas tres razas más extendidas, 'latifolium', 'punctatum' y 'Marie-Galante', abarcan la mayor parte de la variación morfológica en *G. hirsutum*. Las cuatro razas restantes presentan una distribución geográfica más restringida, con raza 'palmeri' en los estados mexicanos de Oaxaca y Guerrero, raza 'morrilli' en la meseta central de México, raza 'richmondi' a lo largo del lado Pacífico del Istmo de Tehuantepec, y raza 'yucatanense' limitada a la costa norte de Yucatán. Este último se conoce solo como un arbusto extenso, pequeño y altamente ramificado que forma un constituyente dominante de la vegetación de playa no disturbada. Hutchinson (1951) consideró a la raza 'yucatanense' como un caso extremo de poblaciones salvajes derivadas de primitivos (d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014).

La persistencia de las poblaciones silvestres de *G. hirsutum* ha sido objeto de considerable debate. Por un lado, la mayoría de las colecciones de germoplasma provienen de hábitats

hechos por el hombre, como parcelas de campo y patios, o hábitats altamente perturbados, como bordes de caminos y vegetación secundaria, lo que indica que las plantas de algodón espontáneas escaparon del cultivo. Además, la diferenciación morfológica parece ser similar y paralela tanto para variedades criollas como para plantas silvestres. Los materiales de prueba de Yucatán, Hutchinson (1951) no observaron diferencias entre las progenies de 'punctatum' de las plantas cultivadas en jardines y las plantas establecidas en la vegetación natural. Por otro lado, Sauer (1967) observó que los algodones silvestres del norte de Yucatán están asociados negativamente con los asentamientos humanos y forman un constituyente dominante de "un complejo tipo de vegetación que ocupa un área coherente y extensa con límites naturales y edáficos y climáticos". esta interpretación en su estudio de la vegetación costera de las Islas Caimán (d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014).

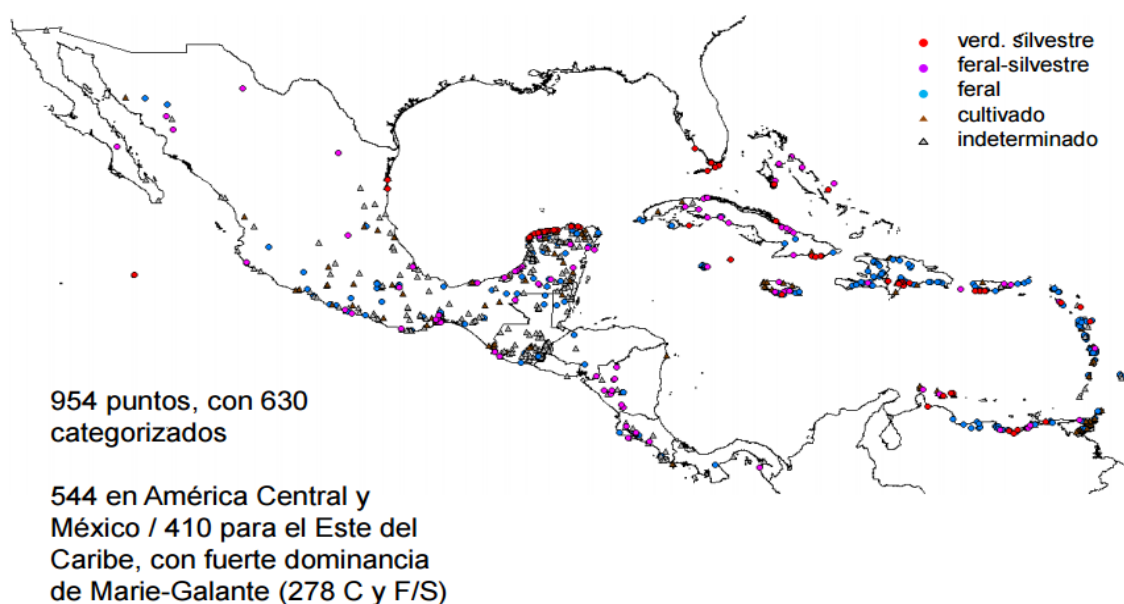


Figura 1. Distribución potencial de algodón feral, silvestre y cultivado de poblaciones de *G. hirsutum* en México y América Central (Tomado de d'Eeckenbrugge & Lacape, 2014).

4. 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. Fryxell (1984), 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>), ya han reportado las especies de *Gossypium* para la región Norte de México, lo que confirma la no compatibilidad. Asimismo, de acuerdo a lo descrito por la CONABIO (2011), no existe más que un reporte dentro del polígono de liberación, pero sólo cercano a zonas de temporal donde no se siembra algodón, lo cual impone una barrera física para la ocurrencia de flujo de genético.

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 la situación improbable de que pudieran quedar en contacto con polen de *G. hirsutum* (tetraploide), el producto de la fecundación sería triploide y durante la

metafase de la meiosis no se podría realizar el apareamiento de homólogos, imposibilitando así la formación de un cigoto fértil por la disparidad de los sistemas genéticos (Stewart, 1995; Wendel et al., 2010; Kantartzi, 2010). A esta barrera genética se debe incluir la barrera temporal para el entrecruzamiento, ya que no se presenta coincidencia en los períodos de floración entre poblaciones silvestres y plantaciones comerciales.

Por otro lado, *G. hirsutum* puede hibridar y tener descendencia viable con *G. barbadense*, aunque la distribución de la especie alotetraploide se encuentra limitada principalmente al sureste de México, lejos de las zonas productoras de algodón comercial en el norte de la República Mexicana.

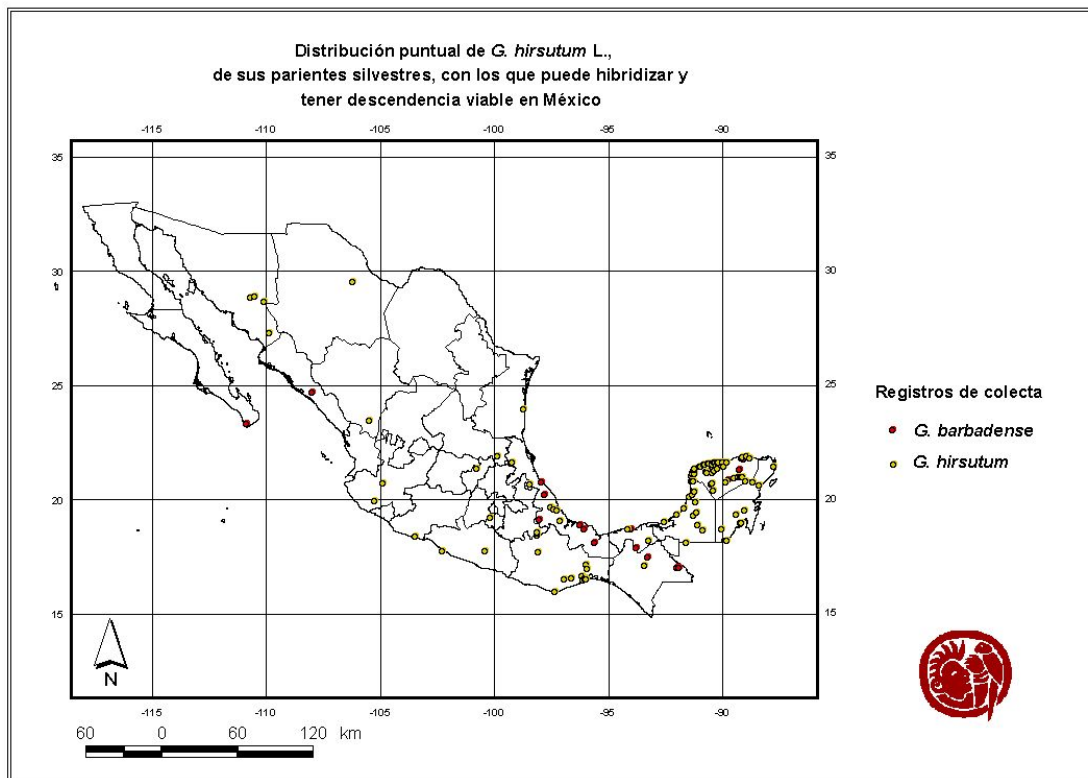


Figura 2. Distribución potencial de *G. hirsutum* L. y de sus parientes silvestres con los que puede hibridar y tener descendencia viable en México (Tomada de CONABIO, s.f).

5. Descripción de los hábitats donde el OVM puede persistir o proliferar en el ambiente de liberación

El algodón AGS001-1 modificado genéticamente, como el algodón cultivado, podría persistir en el mismo hábitat que su contraparte convencional y requiere de la intervención del hombre para poder persistir. Las semillas de *G. hirsutum* normalmente requieren de alguna forma de tratamiento para asegurar una adecuada germinación: un tratamiento de calor y ácido sulfúrico para eliminar la borra de la cubierta de la semilla. Las semillas que podrían escapar del cultivo durante el transporte de la cosecha no necesariamente producirán poblaciones persistentes debido a que requieren pre-tratamientos para poder germinar. La necesidad de humedad suficiente también evita que la semilla pueda germinar en zonas de stress hídrico. Aún en áreas

con alta precipitación, las semillas que escapan tendrán una baja posibilidad de establecerse debido a su relativamente baja capacidad de colonización. Son embargo, existe la posibilidad de que algodones ferales llegaran a interactuar con poblaciones de algodón silvestre de la misma u otra especie tetraploide. En caso de que ocurriera flujo de genes el efecto podría diluirse en ambientes silvestres debido a procesos como deriva meiótica, falta de presiones selectivas que favorezcan su persistencia en comunidades complejas, o por el costo que pudiera representar la presencia de los transgenes (Rocha Munive et. al. 2018)

Las características nuevas en el algodón modificado AGS001-1, son la resistencia al ataque de insectos lepidópteros y la tolerancia al herbicida glifosato, son las únicas diferencias con respecto al algodón convencional.

La lluvia, la latitud, y la elevación son tres factores dominantes que influyen el clima durante el desarrollo de este cultivo. Siendo el algodón una planta tropical, es altamente sensible a temperaturas por debajo de los 10°C, produciendo poco o nulo crecimiento a temperaturas por debajo de los 15.6°C. La temperatura óptima para el crecimiento de brotes del algodón es aproximadamente 30°C; para crecimiento de raíces la temperatura óptima del suelo es entre 29.4°C y 35°C.

El algodón es típico de zonas cálidas, por lo que su adecuado desarrollo requiere de 160 días con temperaturas por encima de los 15°C, adecuada iluminación solar y un mínimo de 50 centímetros cúbicos de agua durante la época de crecimiento. Es importante enfatizar que dicho cultivo no resiste grandes periodos de sequía, aunque se puede cultivar en casi cualquier tipo de suelo, destacándose los de textura media (franco-arenosos finos, francos, franco-limosos y franco-arcillosos gruesos). No se espera que el algodón AGS001-1 presente algún cambio en estos rangos de tolerancia a factores abióticos.

Método de transformación

El algodón AGS001-1 se obtuvo mediante cruce convencional a partir de los eventos MON 15985 (algodón Bollgard® II) y MON 88913 (algodón Solución Faena Flex®).

El algodón Solución Faena Flex® fue obtenido mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* empleando el plásmido PV-GHGT35. La línea parental del algodón Solución Faena Flex® (evento MON 88913) es la variedad de algodón Coker 312 y el evento MON 88913 es transferido a variedades comerciales mediante cruzamiento convencional. Se utilizó la variedad Coker 312 debido a su respuesta positiva al sistema de cultivo de tejidos usando en el proceso de producción de plantas transgénicas. Varios investigadores (Trolinder and Goodin, 1987; Umbeck et al., 1987) han demostrado que la variedad Coker 312 y un grupo de variedades relacionadas a esa línea tienen una característica de respuesta favorable al cultivo de tejidos. La variedad Coker 312, aunque no se cultiva ampliamente, es un cultivar aceptado comercialmente (Australian Government, 2013).

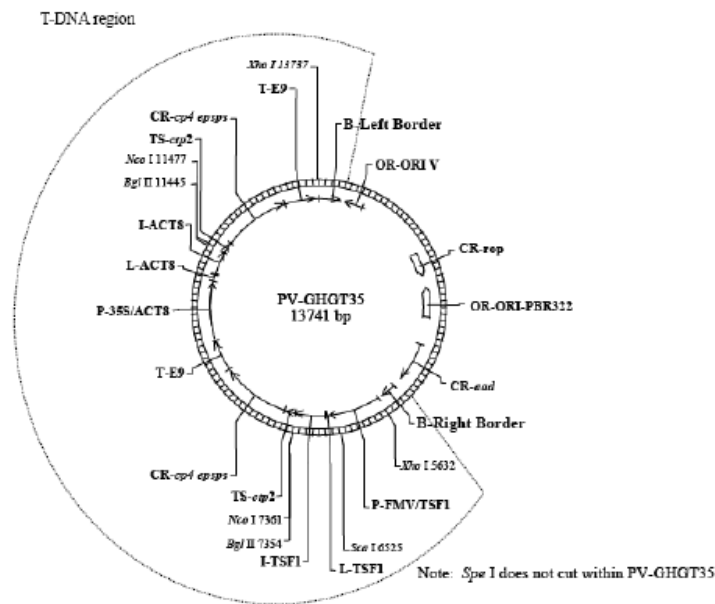


Figura 3. Mapa del plásmido PV-GHGT35 usado para crear el evento de algodón MON 88913 tolerante a glifosato.

Por otro lado, el algodón Bollgard®II evento 15985 se obtuvo mediante la transferencia de los genes *cry2Ab* y *uidA* al algodón Bollgard® variedad DP50 B (que contenía los genes *CryAc*, *nptII* y *aad*). El método utilizado para introducir el gen *cry2Ab* dentro del tejido de la variedad de algodón DP50 B fue el de biobalística, utilizando el plásmido B1579 (ANZFA, 2002).

A: expected



B: actual

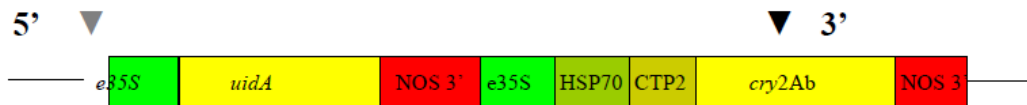


Figura 4. Representación esquemática del ADN plasmídico introducido en el evento de algodón MON 15985 resistente a insectos lepidópteros.

Adicionalmente, para generar el algodón Bollgard® se introdujo el gen *CryAc* a las plantas de algodón de la variedad Coker 312 utilizando la cepa ABI de *Agrobacterium* (ANZFA, 2002). Los procedimientos utilizados para la transformación de explantes de hipocotilos de algodón con *Agrobacterium* fueron de acuerdo a los descritos por Umbeck et al. (1987). La regeneración de las plantas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Trolinder y Goodlin (1987).

6. Organismo receptor y organismos donadores de la construcción genética

Organismo receptor:	<i>Gossypium hirsutum</i> L.: cultivar con varias variedades y líneas de mejoramiento.
Organismos donadores:	<ul style="list-style-type: none">• Los genes Cry1Ac y Cry2Ab fueron aislados de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>. <i>Bacillus thuringiensis</i> es una bacteria gram-positivo que habita de manera natural en el suelo y ha sido utilizada comercialmente durante casi 40 años para el control de insectos. Produce una proteína (endotoxina) que actúa específicamente sobre las larvas de insectos lepidópteros al destruir su sistema digestivo.• El gen CP4 EPSPS fue aislado de la bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> raza CP4. <i>A. tumefaciens</i> es una bacteria común del suelo que causa la enfermedad de agallas de la corona en plantas susceptibles. No ha habido reportes de efectos adversos en el hombre y los animales.

7. Patogenicidad o virulencia de los organismos donadores y receptores

El organismo receptor de la transformación, el algodón cultivado, no se considera un organismo patógeno. Sin embargo, la planta produce gopiol y ácidos grasos ciclopropenoides (CPFA, cyclopropenoid fatty acids), los cuales son tóxicos naturales.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva, facultativa anaeróbica que forma inclusiones de proteína adyacente a la endospora. Las subespecies de Bt pueden sintetizar más de una inclusión parasporal. La proteína producida en el algodón es 99.4% idéntica a la proteína producida por *Bacillus thuringiensis* subespecies *kurstaki* (B.t.k.) de la cepa HD-73. Esta cepa controla insectos plagas por la producción de las proteínas cristal insecticida conocidas como delta-endotoxinas. La proteína delta-endotoxina producida por varias subespecies de Bt exhiben diferencias en la secuencia de aminoácidos para el dominio terminal amino de las proteínas. Estas diferencias son importantes en la acción selectiva contra ciertas insectos plagas. Lo más importante, la acción de la proteína de Bt no tienen efecto contra organismos no blanco tales como los peces, aves y mamíferos debido a que no tienen los receptores en el intestino medio. Esto explica la ausencia de toxicidad de la proteína delta endotoxina de B.t.k. a los organismos no blanco. La proteína B.t.k. expresada muestra especificidad solamente a los insectos del orden lepidóptera y no tiene ningún efecto dañino sobre los organismos no blanco. La proteína Cry2Ab es una versión sintética del gen nativo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. La modificación fue necesaria para proveer secuencias controladoras que permitieran una mejor expresión del gen en las plantas de algodón (Bravo, 1997).

La bacteria *Agrobacterium* sp. cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizosfera de las plantas. Si bien esta bacteria puede causar enfermedades y es considerada una especie patógena, ninguna de las secuencias genéticas que producen los síntomas de la enfermedad forman parte de las secuencias en el algodón modificado genéticamente. Únicamente el gen CP4 EPSPS de esta bacteria fue transferido para producir las líneas de algodón tolerantes a herbicidas. La secuencia del ADN transferido y de la proteína producida es completamente conocida y se encuentra presente en todas las plantas y en la mayoría de los microorganismos que comúnmente son parte de la dieta humana, y no existe evidencia de que esta proteína pueda causar algún efecto negativo en la salud humana o de cualquier otro vertebrado (Fuchs, 1994; Hammond *et al.* 2004).

8. Integridad del inserto

Los datos individuales de cruzamientos con otras variedades comerciales de algodón demuestran la estabilidad de la transferencia del inserto funcional, de generación en generación. Basándose en análisis moleculares, datos sobre la expresión fenotípica y patrones de herencia, se ha demostrado la integración estable del gen Cry1Ac dentro del cromosoma del algodón. Los resultados de dichos estudios se resumen a continuación:

- Análisis por Southern blot de numerosas generaciones de algodón llevados a cabo durante ocho años, han dado como resultado un patrón de Southern blot idéntico, lo que indica la estabilidad del inserto funcional del gen cry1Ac.
- Análisis ELISA de semilla obtenida de ensayos en múltiples localidades, durante ocho años, mostraron niveles similares de las proteínas Cry1Ac y NPTII.
- Se ha confirmado la producción de la proteína Cry1Ac por detección inmunológica y/o datos de eficacia bajo diferentes condiciones ambientales, en numerosas variedades de algodón.
- Se observa herencia mendeliana de las características aportadas después de autopolinización o retrocruzamientos con otras variedades de algodón.
- La eficacia insecticida se ha mantenido durante el desarrollo de este producto, desde su comercialización en 1996.
- La calidad de la semilla del algodón se ha mantenido después de la transferencia del gen cry1Ac dentro de distintas variedades comerciales.

De acuerdo con estos resultados, no existe evidencia o probabilidad de inestabilidad genética o de ineficacia. Además, estos datos confirman que la característica AGS001-1 está integrada establemente en el genoma del algodón.

9. Mecanismo de acción de los genes CP4 EPSPS, Cry1Ac y Cry2Ab

La función de la EPSP es unir el ácido shikímico con el ácido fosfoenolpirúvico (PEP). Como la estructura de PEP y del glifosato son muy similares, el glifosato actúa como inhibidor competitivo y se une fuertemente al complejo formado por el shikimato y la EPSPS, resultando en una acumulación de shikimato en concentraciones tóxicas. El glifosato se transporta simplásticamente hacia los meristemas de la planta en crecimiento y, al actuar como inhibidor competitivo de la EPSPS, resulta en la acumulación de shikimato y el bloqueo de la síntesis de los aminoácidos aromáticos. El mecanismo de acción del herbicida es a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), impidiendo la biosíntesis de los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). En consecuencia, la presencia de glifosato determina la supresión de crecimiento y muerte (Villalba, 2009).

Para el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a glifosato, se aisló el gen que codifica una EPSPS resistente a glifosato de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* (CP4 EPSPS) y se clonó el gen *gox*, que codifica la enzima glifosato oxidoreductasa (responsable del proceso de degradación del glifosato por la ruta del ácido aminometilfosfónico), a partir de la cepa LBAA de *Achromobacter* sp. El gen CP4 EPSPS, derivado de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*, codifica la enzima C4-EPSPS altamente insensible al glifosato. Esta enzima sólo difiere en el

aminoácido de la versión de las plantas (alanina por glicina). En presencia de glifosato, las plantas que expresan C4-EPSPS continúan la síntesis de aminoácidos aromáticos (Villalba, 2009).

En cuanto a las proteínas Cry, el resultado final en que ejecutan su actividad letal conlleva la formación de poros líticos en la membrana apical del intestino medio del insecto susceptible, mediada por el reconocimiento de un receptor proteico. El mecanismo consiste en que, posterior a la ingestión de la espora y el cristal de Bt, estos últimos se solubilizan bajo la fisiología alcalina del intestino medio de la larva susceptible, liberándose la protoxina que a su vez es cortada por proteasas (tripsinas o quimiotripsinas), dejando un fragmento activo de aproximadamente 60-70 kDa. La toxina activa reconoce un receptor tipo caderina (CADR) en la microvellosidad apical intestinal del insecto blanco (plaga). Luego, la hélice α -1 es cortada por proteasas asociadas a vesículas de membrana de la microvellosidad apical, con lo cual se forman oligómeros que interactúan con otros receptores de la membrana apical. Esto genera poros líticos en las balsas lipídicas de la membrana celular, que permiten el paso de iones y agua causando hinchazón, lisis y la posterior muerte del insecto susceptible (Pigott y Ellar, 2007).

10. Toxicidad y alergenicidad de las proteínas expresadas

La proteína CP4 EPSPS y las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab no tienen efectos sobre el metabolismo normal de la planta. Asimismo, la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS no muestra homología con ninguna de las secuencias de los alérgenos en las tres bases de datos de proteínas actuales (Mitsky, 1993) y, por lo tanto, se concluye que la proteína CP4 EPSPS no presenta ningún potencial de alergenicidad para los humanos. Además, la EPSPS es ubicua en la naturaleza y no se espera que sea tóxica o alergénica.

11. Estabilidad fenotípica.

El algodón AGS001-1 contiene una copia completa de los genes transferidos, mismos que se integraron de manera estable al genoma del algodón. Se compararon datos de segregación a través de cuatro generaciones y la frecuencia de los individuos esperados con los observados que expresaban la proteína Cry2Ab. La expresión de la proteína Cry2Ab se analizó mediante ELISA. Todas las generaciones segregaron una sola inserción del gen Cry2Ab. La presencia de la proteína Cry2Ab a través de múltiples generaciones siguió el patrón de herencia mendeliana. La presencia del gen cry2Ab fue confirmada mediante análisis Southern blot.

La estabilidad de la inserción se demostró mediante un análisis Southern blot de ADN genómico de muestras tomadas de tejido de hojas a través de cinco generaciones. No hubo diferencias en el patrón de hibridación entre los fragmentos de ADN extraído de cualquiera de las cinco generaciones. Estos resultados demuestran que la inserción de ADN plásmido PV-GHBK11 es estable en el genoma de plantas a través de cinco generaciones de mejoramiento.

El algodón AGS001-1 se ha llevado por cinco generaciones de retrocruzas sin pérdida del fenotipo de tolerancia a glifosato o rearrreglo de los elementos genéticos transferidos. El material genético y los segregantes del material transferido no presentan el fenotipo de tolerancia al herbicida. Datos obtenidos de análisis de hibridación Southern indican que todos los elementos genéticos transferidos, incluyendo regiones codificantes, promotores y regiones no codificantes, se encuentran presentes como insertos únicos de manera estable en el algodón y de que no se encuentran secuencias del vector no requeridas.

La estabilidad de la tolerancia a glifosato se evaluó mediante análisis Southern blot. La primera generación resultante de la auto polinización segregó en una proporción 3:1 (resistentes y no

resistentes). Generaciones avanzadas (R4 y R5) de plantas homocigotas auto polinizadas segregaron en una proporción 1:0. Estos resultados no son significativamente diferentes a lo esperado de acuerdo la herencia mendeliana; y confirman la homocigosis y estabilidad del carácter dominante a través de múltiples generaciones.

12. Sitio de liberación.

El polígono donde se realizará la liberación está ubicado en las regiones agrícolas de Chihuahua y la Comarca Lagunera que comprende los estados de Coahuila y Durango. El polígono se muestra a continuación.

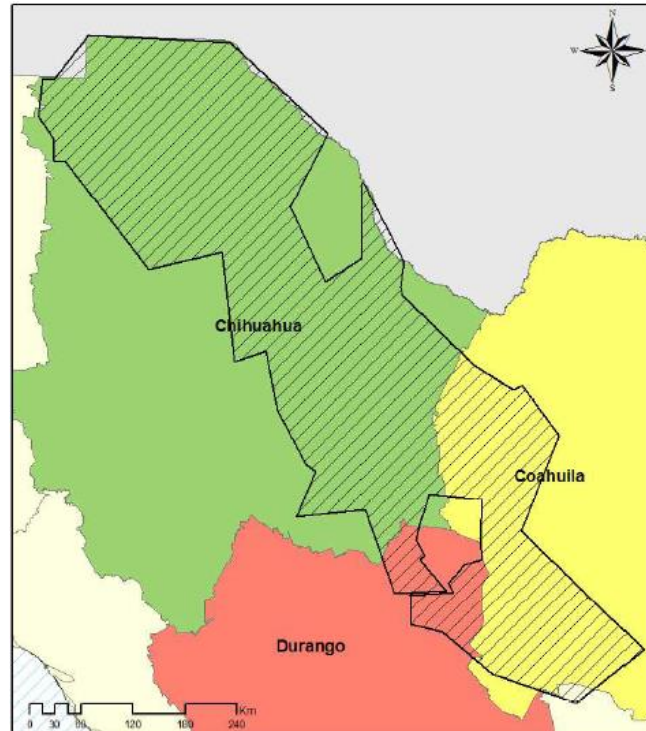


Figura 2. Polígono de liberación en Chihuahua, Coahuila y Durango.

Dicho polígono está ubicado en las regiones algodoneras de Chihuahua y de La Comarca Lagunera. Los municipios comprendidos son: Ahumada, Aldama, Allende, Aquiles Serdán, Ascensión, Buenaventura, Camargo, Casas Grandes, Coronado, Coyame del Sotol, La Cruz, Chihuahua, Delicias, Galeana, Guadalupe, Ignacio Zaragoza, Janos, Jiménez, Juárez, Julimes, López, Manuel Benavides, Matamoros, Meoqui, Namiquipa, Nuevo Casas Grandes, Ojinaga, Praxedis G. Guerrero, Riva Palacio, Rosales, San Francisco de Conchos, Saucillo, Valle De Zaragoza (Chihuahua); Cuatrociénegas, Francisco I. Madero, Matamoros, Parras, San Pedro, Sierra Mojada, Torreón, Viesca (Coahuila) y Gómez Palacio, Lerdo, Mapimí, Tlahualilo (Durango).

Asimismo, dentro del polígono se localizan las ecorregiones nivel IV: “Lomeríos y planicies con matorral xerófilo, pastizal y bosques de encino y coníferas”, “Lomeríos y Sierras bajas del Desierto Chihuahuense Norte con matorral xerófilo micrófilo-rosetófilo”, “Lomeríos y Sierras bajas del Desierto Chihuahuense Sur con matorral xerófilo micrófilo-rosetófilo”, “Piedemontes y Planicies con Pastizal, matorral xerófilo y bosques de encinos y coníferas”, “Planicies del Altiplano Zacatecano Potosino con matorral xerófilo micrófilo-crasicaule”, “Planicies del centro del Desierto Chihuahuense con vegetación xerófila micrófila-halófila”, “Sierra con bosques de coníferas, encinos y mixtos”, “Sierra con bosques de encinos, coníferas y mixtos”, y “Valles endorreicos de Cuatrociénegas con vegetación xerófila micrófila-halófila-gipsófila”.

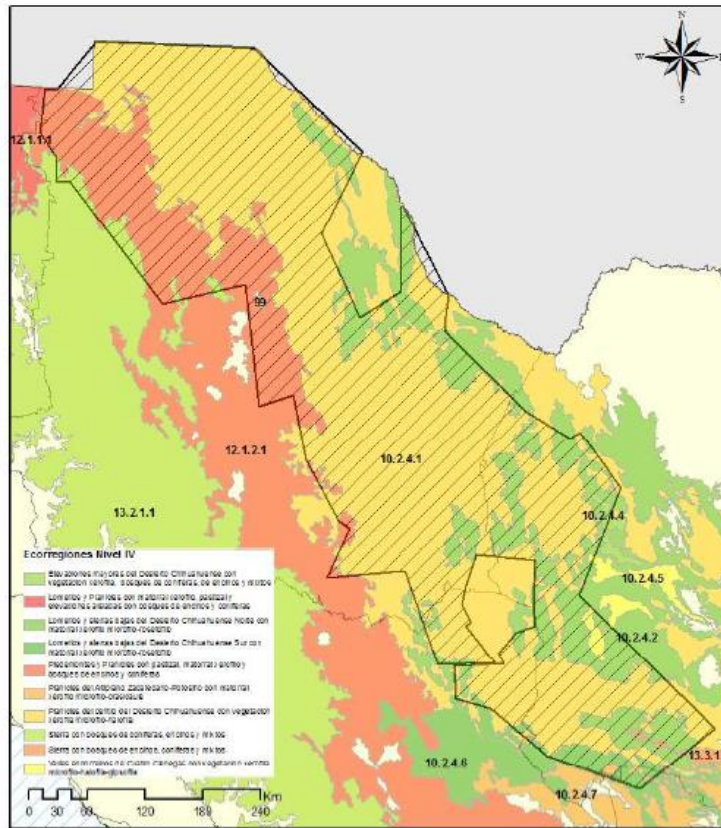


Figura 3. Ecorregiones Nivel IV presentes dentro de los polígonos de liberación propuestos.

13. Método de Detección.

Evento MON 88913

Para la detección específica del ADN genómico del evento MON 88913, se amplifica un fragmento de 94 pb de la región que abarca la unión 5' usando dos cebadores específicos. Los productos de PCR se miden durante cada ciclo (en tiempo real) por medio de una sonda oligonucleotídica específica del objetivo, marcada con FAM como colorante informador en su extremo 5' y MGBNFQ como colorante extintor en su extremo 3' (Delobel et al. 2009).

Para la cuantificación relativa del evento ADN MON 88913, un sistema de referencia específico de algodón amplifica un fragmento de 76 pb de *acp1* (un gen endógeno de algodón que codifica un portador de acilo proteína), usando dos cebadores específicos del gen *acp1* y una sonda específica del gen *acp1* marcada con Colorante FAM y TAMRA como colorante extintor (Delobel et al. 2009).

Las curvas estándar se generan para los sistemas específicos MON 88913 y *acp1* trazando los valores de Ct medidos para los puntos de calibración contra el logaritmo de los números de copia de ADN y ajustando una línea de regresión en estos datos. A partir de entonces, las curvas estándar se utilizan para estimar los números de copias en el ADN de muestra desconocido mediante la interpolación de las curvas estándar (Delobel et al. 2009).

Para la cuantificación relativa del ADN del evento MON 88913 en una muestra de prueba, el número de copia MON 88913 se divide por el número de copia del gen de referencia del algodón (*acp1*) y se multiplica por 100 para obtener el valor porcentual ($GM\% = \text{MON 88913} / \text{acp1} \times 100$) (Delobel et al. 2009).

La muestra de calibración S1 se preparó mezclando la cantidad apropiada de ADN de MON 88913 en ADN de algodón no GM de control para obtener un MON 88913 GM al 10%. La muestra S2 se preparó mediante dilución doble de la muestra S1; la muestra S3 se preparó mediante una dilución de cinco veces desde la muestra de S2; la muestra S4 se preparó mediante una dilución de tres veces de la muestra S3 y la muestra S5 se preparó mediante dilución cuádruple a partir de la muestra de S4 (Delobel *et al.* 2009).

Los números de copia absoluta en las muestras de la curva de calibración se determinan dividiendo el peso del ADN de la muestra (nanogramos) por el valor promedio publicado de 1C para el genoma del algodón (Delobel *et al.* 2009).

Evento 15985

Para la detección específica del ADN genómico del evento MON 15985, se amplifica un fragmento de 82 pb de la región que abarca la unión 3' usando dos cebadores específicos. Los productos de PCR se miden en cada ciclo por medio de una sonda oligonucleotídica específica para el objetivo marcada con colorante FAM y TAMRA como colorante extintor (Savini *et al.* 2008).

Para la cuantificación relativa del evento ADN MON 15985, un sistema de referencia específico de algodón amplifica un fragmento de 76 pb de *acp1* (un gen endógeno de algodón que codifica un portador de acilo proteína), usando dos cebadores específicos del gen *acp1* y una sonda específica del gen *acp1* marcada con Colorante FAM y TAMRA como colorante extintor (Savini *et al.* 2008).

Las curvas estándar se generan para los sistemas específicos MON 15985 y *acp1* trazando los valores de Ct medidos para los puntos de calibración contra el logaritmo de los números de copia de ADN y ajustando una línea de regresión en estos datos. A partir de entonces, las curvas estándar se utilizan para estimar los números de copias en el ADN de muestra desconocido mediante la interpolación de las curvas estándar (Savini *et al.* 2008).

Para la cuantificación relativa del ADN del evento MON 15985 en una muestra de prueba, el número de copia MON 15985 se divide por el número de copia del gen de referencia del algodón (*acp1*) y se multiplica por 100 para obtener el valor porcentual ($GM\% = \text{MON 15985} / \text{acp1} \times 100$) (Savini *et al.* 2008).

La muestra de calibración S1 se preparó mezclando la cantidad apropiada de ADN de MON 15985 en ADN de algodón no GM de control para obtener un MON 15985 GM al 10%. La muestra S2 se preparó mediante dilución doble de la muestra S1; la muestra S3 se preparó mediante una dilución de cinco veces desde la muestra de S2; la muestra S4 se preparó mediante una dilución de tres veces de la muestra S3 y la muestra S5 se preparó mediante dilución cuádruple a partir de la muestra de S4 (Savini *et al.* 2008).

Los números de copia absoluta en las muestras de la curva de calibración se determinan dividiendo el peso del ADN de la muestra (nanogramos) por el valor promedio publicado de 1C para el genoma del algodón (Savini *et al.* 2008).

Referencias bibliográficas

- Álvarez, I., Cronn, R., & Wendel, J. F. (2005). Phylogeny of the New World diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae) based on sequences of three low-copy nuclear genes. *Plant Systematics and Evolution*, 252(3-4), 199-214.
- Australian Government. (2013). Commercial release of GM herbicide tolerant (Roundup Ready Flex MON 88913) pima cotton in Australia. Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator. 1-48.
- Baffes, J. (2005). The "cotton problem". *The World Bank Research Observer*, 20(1), 109-144.
- Bravo, A. (1997). Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol* 179:2793-2801.
- Brubaker, C.L., Bourland, F.M., Wendel, J.F. (1999). The origin and domestication of cotton. In: Smith CW, Cothren JT, editors. Cotton, Origin, history, technology, and production: Wiley Series in crop science. pp. 3–31
- Chapagain, A. K., Hoekstra, A. Y., Savenije, H. H. G., & Gautam, R. (2006). The water footprint of cotton consumption: An assessment of the impact of worldwide consumption of cotton products on the water resources in the cotton producing countries. *Ecological economics*, 60(1), 186-203.
- CCIA, Comité Consultivo Internacional del Algodón, 2018. Consultado 26 de julio de 2018. <https://www.icac.org/Press-Release/2017/PR-24-17-Global-Cotton-Production-Continues-to-Recover>
- d'Eeckenbrugge, G. C., & Lacape, J. M. (2014). Distribution and differentiation of wild, feral, and cultivated populations of perennial upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Mesoamerica and the Caribbean. *PLoS One*, 9(9), e107458.
- Delobel, C., Luque-Perez, E., Pinski, G., Bogni, A., Mazzara, M., & Van den Eede, G. (2009). Event-specific Method for the Quantification of Cotton MON 88913 Using Real-time PCR.
- Edge, J. M., Benedict, J. H., Carroll, J. P., & Reding, H. K. (2001). Bollgard cotton: an assessment of global economic, environmental, and social benefits.
- ANZFA. (2002). Oil and linters derived from insectprotected cotton containing event 15985. Food Standards Australia New Zealand. 1-80
- Fryxell, P. A. (1984). *Taxonomy and germplasm resources* (No. cotton, pp. 27-57). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Fuchs, R.L. (1994). "Gene Expression and Compositional Analysis from Field-Grown Insect Resistant Cotton Tissues", Study Number 92-01-36-07, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID#43168701.
- Hammond, B., Dudek, R., Lemen, J., & Nemeth, M. (2004). Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. *Food and Chemical Toxicology*, 42(6), 1003-1014.
- Hutchinson, J.B. (1951). Intra-specific differentiation in *Gossypium hirsutum*. *Heredity* 5: 169–193.
- Liu, Q., Brubaker, C. L., Green, A. G., Marshall, D. R., Sharp, P. J., & Singh, S. P. (2001). Evolution of the FAD2-1 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium* (Malvaceae). *American Journal of Botany*, 88(1), 92-102.

- Mitsky, T. A. (1993). 700 Chesterfield Parkway North, St Louis, MO, USA 63198, Comparative alignment of CP4 EPSPS to known allergenic and toxic proteins using Fasta algorithm. *Unpublished. Monsanto Report No. MSL, 12820.*
- Palomo, A. G., & Godoy, A. S. (1996). Genetic analysis of earliness in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). II. Yield and lint percentage. *Euphytica, 105*, 161-166.
- Percival, A. E., & Kohel, R. J. (1990). Distribution, collection, and evaluation of *Gossypium*. In *Advances in agronomy* (Vol. 44, pp. 225-256). Academic Press.
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71*(2), 255-281.
- Rocha-Munive, M. G., Soberón M., Castañeda, S. Niaves E., Scheinvar E., Eguiarte, L. E. Mota-Sánchez D., Rosales-Robles E, Nava-Camberos U., Martínez-Carrillo J.L., Blanco C.A., Bravo A. & SouzaV, 2018. Evaluation of the impact of Genetically Modified cotton after 20 years of cultivation in Mexico, *Front. Bioeng. Biotechnol. 6*:82. doi: 10.3389/fbioe.2018.00082.
- Sauer, J.D. (1967). Geographic reconnaissance of seashore vegetation along the Mexican gulf coast; Mc Intire WG, editor. Baton Rouge. 59 p.
- Savini, C., Mazzara, M., Munaro, B., & Van den Eede, G. (2008). Event-specific Method for the Quantification of Cotton Line MON 15985 Using Real-time PCR.
- Trolinder, N. L., & Goodin, J. R. (1987). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports, 6*(3), 231-234.
- Ulloa, M., Stewart, J. M., Garcia-c, E. A., Godoy-a, S., Gaytan-m, A., & Acosta, N. S. (2006). Cotton genetic resources in the western states of Mexico: in situ conservation status and germplasm collection for ex situ preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution, 53*(4), 653-668.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K., & Swain, W. (1987). Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Nature Biotechnology, 5*(3), 263.
- Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas: Glifosato. *Ciencia, docencia y tecnología, (39)*, 169-186.
- Wendel, J. F., Cronn, R., Small, R. L., Haselkorn, T., & Wendel, J. F. (2003). Cryptic repeated genomic recombination during speciation in *Gossypium gossypoides*. *Evolution, 57*(11), 2475-2489.
- Wendel, J.F, Brubaker, C.L, & Seelenan, T. (2010). The origin and evolution of *Gossypium*. In: Stewart JM, Oosterhuis DM, Heitholt JJ, Mauney JR, editors. *Physiology of cotton*. Dordrecht: Spinger, Netherlands. pp. 1–18.
- Yilmaz, I., Akcaoz, H., & Ozkan, B. (2005). An analysis of energy use and input costs for cotton production in Turkey. *Renewable Energy, 30*(2), 145-155.