

FORMULARIO INICIAL
DIRECTRICES TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO DE
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS
MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA
DIRECCION DE SERVICIOS DE PROTECCION FITOSANITARIA
SOLICITUD DE PERMISO DE IMPORTACION, LIBERACION Y/O MOVILIZACION
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE (O.V.M.) BIO-02

1. Nombre y dirección de la empresa o institución solicitante: BAYER CENTRAL AMERICA, S.A. Edificio Eurocenter II, 5to Piso. 400 m E del Mall Real Cariari, Barreal de Heredia (frente a CENADA).			
2. Teléfono: 2589-8900		Fax: 2589-8999	
3. TIPO DE ACTIVIDAD REQUERIDA Movilización <input checked="" type="checkbox"/> Importación Liberación al medio ambiente Importación y liberación <input checked="" type="checkbox"/> Movilización y liberación	4. ESTA SOLICITUD ES: <input checked="" type="checkbox"/> Nueva Extensión Suplementaria		5. MEDIOS DE MOVILIZACION Correo Equipaje de mano <input checked="" type="checkbox"/> Otro, especifique: Aéreo
6. COMPLETAR	Nombre Científico	Nombre común	Nombre comercial
a. Organismo donador:	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>Streptomyces</i>	
b. Organismo receptor:	<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodón	
c. Agente vector o vectores:	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agrobacterium.	
d. Organismo vivo modificado (transgénico)	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Algodón	ALGODÓN LIBERTY LINK (LLCOTTON25) OECD: ACS-GHØØ1-3
7. CANTIDAD TOTAL DEL ORGANISMO VIVO MODIFICADO Importador: <u>Bayer Central America, S. A.</u> Liberar: _____ Itinerario propuesto: _____ Nº introducciones: _____		8. FECHA DE IMPORTACION O MOVILIZACION Puerto de entrada: Aeropuerto Juan Santamaría	
9. PAIS DE ORIGEN DEL ORGANISMO VIVO MODIFICADO ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		10. DESTINO FINAL DE LA IMPORTACION, MOVILIZACION O LIBERACION Liberia-Guanacaste.	
11. ADJUNTO LA INFORMACION QUE COMPLETA LA PRESENTE SOLICITUD:			
12. FIRMA DEL RESPONSABLE	13. NOMBRE Y CARGO QUE OCUPA EN LA EMPRESA Erwin Gamboa Segura Especialista en Asuntos Regulatorios y Operaciones		14. FECHA
PARA SER LLENADO POR LA DIRECCION DE SERVICIOS DE PROTECCION FITOSANITARIA			
Información completa: Si No	Fecha de recepción de la solicitud:	Fecha de inicio del análisis de solicitud:	
Fecha de expiración:	Certificado fitosanitarios Si No	Firma de la DSPF	

INDICE

FORMULARIO INICIAL	1
INFORMACION COMPLEMENTARIA DE LA SOLICITUD:	3
PARTE A: DATOS GENERALES DEL SOLICITANTE	3
1. Nombre, dirección particular, número telefónico, número de cédula y curriculum de la persona responsable.	3
2. Nombre, dirección del importador y/o fabricantes.	3
3. Nombre, dirección y número telefónico de otras personas involucradas en los ensayos.....	3
4. Nombre, dirección y número telefónico de la(s) persona(s) que haya(n) desarrollado o facilitado el organismo vivo modificado.	3
5. Nombres científicos, comunes, comerciales y todas las designaciones para identificar el o los organismos receptores, agentes vectores empleados en la construcción de cada organismo vivo modificado.	5
PARTE B: MOVILIZACIÓN	5
1. Descripción del envase o empaque que se usará para movilizar el producto.....	5
2. Cantidad de organismo vivo modificado a movilizar, calendario propuesto de movilización	5
3. Descripción del sustrato que acompaña al organismo vivo modificado durante su movilización y una descripción detallada del método que se empleará para su construcción.	5
4. Ruta de movilización, desde el lugar de origen hasta su destino propuesto, incluyendo destinos intermedios y destinos finales.	5
5. Descripción del procedimiento y medidas de bioseguridad que deben ser utilizadas para prevenir el escape y diseminación del organismo vivo modificado durante su movilización	6
PARTE C: INFORMACION ESPECIFICA DEL ORGANISMO VIVO MODIFICADO	6
1. Objetivo o propósito de la introducción, movilización y/o liberación al medio ambiente del organismo vivo modificado.	6
2. Descripción del material antes de la modificación genética: Ciclo de vida con énfasis especial sobre autocruzamiento, polinización, hábitat, especies silvestres y distribución de estas, mecanismos y frecuencia de autocruzamiento con miembros de la especie y especies filogenéticamente cercanas, y cuando se trate de organismos de origen microbiano: Ciclo de vida, características de patogenicidad, hospederos, descripción de etapas de desarrollo (inóculo, tipos de inóculo, penetración, etc.) diseminación, invernación e interacción con otros microorganismos.	6
3. Descripción de las características genéticas del organismo donador, organismo receptor y vector, así como el país y localidad de origen.....	8
4. Descripción de la modificación actual o anticipada conferida por el material genético incorporado en el organismo vivo modificado y de como difiere del organismo no modificado. Anexar mapas de dicha construcción genética.....	9
5. Explicar detalladamente la biología molecular del sistema (p.e. donador-receptor-vector) que sustenta la obtención del producto manipulado.	10
6. Declaración sobre la existencia del impacto potencial en el medio ambiente que se pueda derivar de la liberación del organismo.	11
7. Debe señalarse detalladamente el diseño experimental propuesto para la liberación al medio ambiente y sistema de producción	16
8. Cantidad total del organismo vivo modificado genéticamente que se va a liberar y que cantidad se utilizará para cada ensayo en caso de que se establezcan varios. Elaborar un calendario en el que se indiquen las prácticas agronómicas (p.e. siembra, trasplante) y ensayos propuestos.	16
9. Anexar un mapa del sitio del ensayo indicando localización geográfica y la localidad exacta donde se establecen los ensayos del organismo vivo modificado, tomando en cuenta lo siguiente:	16
10. Detallar los procedimientos y medidas de bioseguridad que se usarán para prevenir la contaminación, escape y diseminación sin control del producto.	17
11. Descripción detallada del método propuesto de disposición final del organismo vivo modificado al término del experimento, así como la disposición final o limpieza de otros materiales que hayan tenido contacto con el material transgénico durante el ensayo.	17
12. Historial de liberaciones anteriores, indicando: lugar, número de permiso y fecha de autorización .	17

INFORMACION COMPLEMENTARIA DE LA SOLICITUD:

PARTE A: DATOS GENERALES DEL SOLICITANTE

1. **Nombre, dirección particular, número telefónico, número de cédula y curriculum de la persona responsable.**

Responsable Técnico:

Erwin Gamboa Segura
Tel. 8932-2770, céd 1-949-744

Responsable Legal:

Omar Arias López
Tel. 88210889, céd 1-594-353

2. **Nombre, dirección del importador y/o fabricantes.**

BAYER CENTRAL AMERICA, S.A.

Edificio Eurocenter II, 5to Piso. 400 m E del Mall Real Cariari, Barreal de Heredia (frente a CENADA).

Cédula Jurídica: 3-101-534305.

3. **Nombre, dirección y número telefónico de otras personas involucradas en los ensayos.**

Art Simpson, Director Cotton Supply Chain

3223 South Loop 289, Suite 325. Lubbock, Texas 79423. EEUU.
Tel. 806-765-8844

Ali Scott, Gerente de Asuntos Regulatorios para las Américas.

2 T.W. Alexander Drive, Research Triangle Park, NC 27709. EEUU.
Tel. 919-549-2159

Steve Miller, Parent Seed Cotton Supply Chain

7 Seed Plant Road. Stoneville, MS 38776. EEUU.
Tel. 662-686-2334

4. **Nombre, dirección y número telefónico de la(s) persona(s) que haya(n) desarrollado o facilitado el organismo vivo modificado.**

El gen *bar*

Bayer BioScience N.V.
Technologiepark 38
9052 Gent 38
Belgium

LA SEMILLA

Bayer CropScience -David Becker
Route 1, Box 152.
Lubbock, TX USA
Tel: 001(806)762-6021.

Bayer Cotton Seed International –Joe Johnson
Transgenic Cotton Breeder
117 Kennedy Flat Rd
Leland, MS 38756
Tel:001-662-686-9235
Cell: 001-662-822-352

Bayer CropScience -Linda Trolinder-Wright
Cotton Development Manager
Rt 1 Box 152
Lubbock, Texas 79401
Tel 001-806 765 8844
Fax 001-806-763-2564

Bayer BioScience NV es el nombre local de la Compañía Bayer en Bélgica donde se realizó la transformación.

Bayer CropScience y BCSI Internacional son filiales de la compañía Bayer en el desarrollo del producto y se encuentran en Texas y Mississippi, Estados Unidos.

5. Nombres científicos, comunes, comerciales y todas las designaciones para identificar el o los organismos receptores, agentes vectores empleados en la construcción de cada organismo vivo modificado.

La presente *Solicitud de Permiso de Importación, Liberación y/o Movilización de O.V.M.* comprende el siguiente material: **ALGODÓN LIBERTY LINK (LLCOTTON25)**

El identificador único OECD a nivel mundial para este evento es: OECD ID: ACS-GHØØ001-3. El nombre de este evento dentro de la compañía es Algodón Liberty Link (LLCotton25).

	<u>Nombre Científico</u>	<u>Nombre Común</u>
a. Organismo donador	<i>Streptomyces higroscopicus</i>	Streptomyces
b. Organismo receptor	<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodón
c. Vector o agente vector	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agrobacterium Vector creado: pGSV71
d. Organismo regulado	<i>Gossypium hirsutum</i>	ALGODÓN LIBERTY LINK (LLCOTTON25)

PARTE B: MOVILIZACIÓN

1. Descripción del envase o empaque que se usará para movilizar el producto.

Envases:

La semilla se envía usualmente en una bolsa doble de polietileno o, dependiendo de la cantidad, dentro de sobres embalados dentro de una caja. Todos los contenedores o envases, sean cajas, sobres o bolsas, contarán con etiquetas que identifican claramente el producto que contienen, siguiendo el formato Bio-04 según el Artículo 122 del Reglamento N° 26921 a la Ley Fitosanitaria 7664.

2. Cantidad de organismo vivo modificado a movilizar, calendario propuesto de movilización

Información disponible en el registro de este evento.

3. Descripción del sustrato que acompaña al organismo vivo modificado durante su movilización y una descripción detallada del método que se empleará para su construcción.

El material transgénico será transportado en forma de semilla. No habrá ningún sustrato ni otro material biológico que acompañe al producto manipulado durante su movilización.

4. Ruta de movilización, desde el lugar de origen hasta su destino propuesto, incluyendo destinos intermedios y destinos finales.

Toda la semilla que ingresa viene en envases contenedores de plástico con su respectiva etiqueta. En dicha etiqueta se indica el número y/o nombre del material o línea que contiene y que se trata de material regulado. Esta identificación se mantendrá durante todo el proceso del ensayo.

En caso de no poder sembrar inmediatamente después de que el material sea trasladado al sitio del ensayo, el mismo se almacenará en la Planta de Bayer en Liberia hasta el momento de la siembra.

Todo el material a ser importado provendrá de los Estados Unidos y llegará por vía aérea al Aeropuerto Juan Santamaría.

5. Descripción del procedimiento y medidas de bioseguridad que deben ser utilizadas para prevenir el escape y diseminación del organismo vivo modificado durante su movilización

Embarque de semillas: Las semillas serán transportadas en sacos de papel o bolsas de alta resistencia sellados herméticamente para prevenir cualquier derrame desde el origen hasta el sitio de su liberación en campo. Al documentar los embarques de semilla, se harán todas las especificaciones pertinentes a la compañía transportadora para que el material sea manipulado con cuidado y evitar rompimiento de los sacos. En caso de derrame accidental de semilla durante el transporte, la empresa transportadora tendrá indicaciones para que se recoja la semilla derramada y mantengan el material bajo resguardo hasta que Bayer sea notificado y en conjunto con las autoridades reguladoras de Costa Rica se tomen las medidas conducentes. Todos los sacos con semilla estarán debidamente etiquetados en forma visible para prevenir cualquier confusión en su manejo.

PARTE C: INFORMACION ESPECÍFICA DEL ORGANISMO VIVO MODIFICADO

1. Objetivo o propósito de la introducción, movilización y/o liberación al medio ambiente del organismo vivo modificado.

El único objetivo de la introducción del organismo vivo es el incremento de semilla para luego exportar ésta a su país de origen. No se van a realizar cruces de ningún tipo ni cualquier otra actividad diferente al incremento de semilla con este material en Costa Rica.

2. Descripción del material antes de la modificación genética: Ciclo de vida con énfasis especial sobre autocruzas, polinización, hábitat, especies silvestres y distribución de estas, mecanismos y frecuencia de autocruzas con miembros de la especie y especies filogenéticamente cercanas, y cuando se trate de organismos de origen microbiano: Ciclo de vida, características de patogenicidad, hospederos, descripción de etapas de desarrollo (inóculo, tipos de inóculo, penetración, etc.) diseminación, invernación e interacción con otros microorganismos.

El cultivo del algodónero (*Gossypium hirsutum* L.).

El algodón ha sido cultivado en climas tropicales y subtropicales del mundo desde tiempos prehistóricos. Aunque las especies de algodón silvestre en la mayoría de los casos son perennes, las especies de algodón domesticadas son cultivadas generalmente como cultivos anuales. En el ámbito mundial el algodón es la fuente de fibra más importante para la industria textil y la segunda fuente de aceite de origen vegetal, ubicándose después de la soya.

Origen y especies del género *Gossypium*.

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 Africa 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 (Poehlman y Sleper, 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 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.

Floración y polinización del algodón

Las flores del algodónero 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. El algodón se considera una especie autógama. La polinización ocurre durante unas pocas horas de la mañana del día de la apertura de la flor. La corola se torna de color rojo un día después de la antesis y más tarde se cae de la planta. El periodo de floración puede ser de 20 días en promedio.

Potencial de polinización cruzada

El potencial de polinización cruzada o "outcrossing" puede definirse como la habilidad de los genes de escapar hacia parientes silvestres del algodón. El flujo de genes puede ocurrir de manera vegetativa, por semilla o por polen. La propagación vegetativa es poco común para el algodón y la dispersión de semillas por viento y animales es raramente exitosa debido a las propiedades de la estructura del capullo. El polen de algodón no se transfiere por el viento debido a su naturaleza grande, pesada y pegajosa (Niles y Feaster, 1984). La polinización cruzada natural se debe al traslado del polen por insectos, siendo las abejas los polinizadores más importantes de algodón (McGregor, 1976).

Algunos estudios de polinización cruzada sugieren que el movimiento de polen disminuye muy rápido a medida que aumenta la distancia a la fila donde se encuentra el polen marcado, y la

transferencia de polen más allá de 12 metros es muy baja. Vaissière (1990) preparó un estudio conteniendo una revisión de la literatura sobre polinización de algodón y un resumen de su estudio, "Dispersión y Traslado de Polen en Algodón Upland", conducido en Texas en 1983. (Ver folio 000204 a 000214). El estudio de Texas se llevó a cabo utilizando una línea macho estéril rodeada por plantas masculinas fértiles. Se suministraron sesenta colonias de abejas. Los resultados mostraron que el traslado de polen en algodón upland disminuye en proporción a la inversa de la distancia a la fila polinizadora más cercana y no hubo un traslado significativo de polen más allá de los 12 metros. Meredith y Bridge (1973) no detectaron outcrossing entre plantas adyacentes en un estudio realizado en Stoneville, MS; el límite aproximado de detección para el tamaño de la muestra y los métodos fue de aproximadamente 0.046%. En otros estudios mencionados por Hutmacher, *et al.*, (2006), se reafirma que la frecuencia de polinización cruzada natural disminuye conforme aumenta la distancia entre las plantas donadoras y receptoras. Según estos autores, se ha visto que la frecuencia de polinización cruzada natural puede disminuir desde 2,17% en hileras adyacentes a 1,42 en hileras con 2 m de separación y cero en hileras a 10 m de distancia.

A pesar de que no se cuenta con datos de estudios hechos a nivel local, estas investigaciones sugieren que independientemente de la localidad, se mantiene la tendencia de disminución del porcentaje de polinización cruzada conforme aumenta la distancia desde la fuente de polen.

Según la base de datos del INBio, a la fecha en Costa Rica se han identificado ocho especímenes de *Gossypium hirsutum* y un espécimen de *G. barbadense* en la Vertiente Pacífica (<http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0250/f01572/g008192/s024849.htm>). Sin embargo, ninguno de estos hallazgos se reporta en la localidad donde se realizarán los ensayos. Ya se ha iniciado el levantamiento de especies vegetales asociadas al cultivo de algodón en las áreas de siembra y producción y sus alrededores. Estos estudios se completarán en coordinación con el Programa de Biotecnología y los expertos aprobados por las autoridades pertinentes.

Es experiencia de Bayer que, por razones climáticas y condiciones de suelo, cualquier semilla de algodón remanente germinaría en el campo fuera de época de cultivo y se eliminará durante la época de monitoreo. De no ser así, se pudriría en el suelo y por lo tanto quedaría sin viabilidad.

En el caso de nuestros ensayos, el algodón será plantado en áreas más bajas que los alrededores (lowland) 0-100 msm, rodeado ya sea por pastizales o por árboles. Los cerros y la vegetación circundante actuarán como barreras naturales al flujo de polen, en caso que algo de polen fuera a ser transportado por el viento, aunque como ya se mencionó, naturalmente el polen de algodón no se transporta de esta forma.

3. Descripción de las características genéticas del organismo donador, organismo receptor y vector, así como el país y localidad de origen.

ORGANISMOS DONADORES

El organismo donador del gen de resistencia a glufosinato de amonio (*bar*) es *Streptomyces hygroscopicus*. *S. hygroscopicus* es una bacteria gram positiva saprofítica común del suelo, no patogénica y sin ningún informe sobre efectos adversos para el hombre o animales (Bartsch *et al.*, 1989).

Debido a que el gen *bar* nativo tiene un codón de iniciación GTG, el extremo N-terminal de la región codificante del gen fue sustituido por dos oligonucleótidos sintéticos complementarios con el fin de obtener un codón ATG, para garantizar la correcta traducción en plantas (De Block *et al.*, 1987).

El gen *bar* codifica la enzima fosfinotricin acetiltransferasa (PAT), la cual proporciona resistencia a la actividad fitotóxica del glufosinato de amonio. *S. hygroscopicus* produce el antibiótico bialafos. Bialafos (syn. L-fosfinotricil-L-alany-L-alanina) es un tripéptido herbicida activo que consiste de dos moléculas de L-alanina y un análogo del ácido L-glutámico denominado fosfinotricina. Cuando es liberado por las peptidasas, la mitad L-fosfinotricina es un potente inhibidor de la

glutamino sintetasa (GS) (Bayer *et al.*, 1972). L-fosfinotricina es el componente activo de varios herbicidas comerciales. L-fosfinotricina es un potente inhibidor de la enzima GS tanto en bacterias como en plantas, donde aparentemente se une competitivamente a la enzima desplazando el L-glutamato del sitio activo. Evidentemente, GS se une a L-fosfinotricina mejor que al sustrato. GS juega un rol central en el metabolismo de nitrógeno de plantas superiores, donde es la única enzima en plantas que puede detoxificar el amoníaco liberado por la reducción de nitratos, degradación de aminoácidos y foto respiración (Mifflin y Lea, 1976). El amoníaco, si bien es un nutriente y metabolito vegetal, es tóxico en exceso y ocasiona la muerte de las células de la planta (Tachibana *et al.*, 1986).

Si bien la forma GS de *S. hygroscopicus* es sensible a la L-fosfinotricina, la bacteria produce una enzima inactivante, PAT. PAT cataliza la conversión de L-fosfinotricina a N-acetyl-L-fosfinotricina en presencia de acetyl CoA como co-sustrato. N-acetyl-L-fosfinotricina no inactiva la GS y, por lo tanto, no tiene actividad herbicida.

El gen *bar* codifica para una enzima PAT de 183 aminoácidos con un peso molecular aparente de 21-22 Kdal. Esta enzima es una acetyl transferasa que cataliza específicamente la acetilación de fosfinotricina (PPT) y demetyl fosfinotricina (DMPT) (Thompson, *et.al.*, 1987). Esta enzima tiene la habilidad de conferirle tolerancia al herbicida Liberty® a aquellas plantas modificadas con el gen *bar*. La tolerancia al herbicida es una consecuencia de la inhibición de la actividad glutamino sintetasa en plantas.

ORGANISMO VECTOR:

El algodón transgénico se obtuvo mediante transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. La expresión de los genes introducidos es utilizada como evidencia de transformación. La expresión de la enzima PAT es detectada rociando los plantines en cultivo con GA (glufosinato de amonio). Los plantines sobrevivientes son transferidos al suelo, cultivados en invernadero y luego seleccionados por la resistencia al glufosinato. El nombre del vector creado es pGSV71.

ORGANISMO RECEPTOR

La línea de origen es la variedad de algodón Coker 312. Esta vieja variedad de algodón se cultiva todavía en superficies reducidas. Bayer CropScience y sus compañías de semillas están transfiriendo las características de la línea LLCotton25 a variedades comerciales mediante técnicas de mejoramiento convencional. Se utilizó la variedad Coker 312 debido a su respuesta positiva al sistema de cultivo de tejidos usado en el proceso de producción de plantas transgénicas.

Petición de Estado No Regulado

En los Estados Unidos, el Evento LLCotton25 fue aprobado para cultivo (Marzo 10, 2003) y para usos alimenticios humano y animal (FDA – Abril 2, 2003).

Estado en la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA)

Debido a que el evento de transformación LLCotton25 no contiene ninguna proteína pesticida, el cultivo no se encuadra dentro del alcance de la US EPA. Sin embargo, el uso del herbicida Liberty en conjunto con el evento de transformación LLCotton25 cae bajo la jurisdicción de la EPA. El registro se otorgó el 29 de Septiembre de 2003, junto con el establecimiento de una tolerancia para residuos de glufosinato de amonio en algodón.

- 4. Descripción de la modificación actual o anticipada conferida por el material genético incorporado en el organismo vivo modificado y de como difiere del organismo no modificado. Anexar mapas de dicha construcción genética.**

Elementos genéticos de la construcción

Elemento genético	Donante	Función
RB (BD):	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Repetición del borde derecho del ADN-TL de <i>Agrobacterium</i>
P35S3:	Virus del Mosaico de la Coliflor	Región promotora
bar :	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Secuencia de codificación del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa
3'nos:	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintetasa del ADN-T de <i>Agrobacterium</i>
LB (BI):	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Repetición del borde izquierdo del ADN-TL de <i>Agrobacterium</i>

La única modificación que ha sido introducida en estas plantas comparadas con sus contrapartes convencionales es la tolerancia a glufosinato de amonio. Aparte de la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, no hay diferencia en fenotipo entre este material y su contraparte no transgénica.

El algodón LibertyLink es tolerante a aplicaciones de glufosinato de amonio 4 veces superiores a la dosis de aplicación recomendada comercialmente.

No se han observado efectos no intencionales de estas plantas en comparación con sus contrapartes convencionales. Los estudios de comparación fenotípica no muestran diferencias significativas de relevancia.

5. Explicar detalladamente la biología molecular del sistema (p.e. donador-receptor-vector) que sustenta la obtención del producto manipulado.

Donador

El algodón LibertyLink (LLCotton25) expresa la proteína PAT, codificada por el gen *bar* aislado de *Streptomyces hygroscopicus*.

S. hygroscopicus es una bacteria saprofítica común del suelo, no patogénica y sin ningún informe sobre efectos adversos para el hombre o animales (Bartsch *et al.*, 1989).

Ausencia de secuencias no deseadas

No se utilizaron genes marcadores de resistencia a antibióticos en la construcción del ADN-T ni en el proceso de transformación. Ningún otro gen o secuencia genética del plásmido fue incorporado en el proceso de transformación. La transformación con el plásmido pGSV71 mediada por *Agrobacterium* resulta en la transferencia al genoma de la planta del fragmento de ADN-T comprendido entre las secuencias borde únicamente. Los genes de *A. tumefaciens* que causan la enfermedad de las agallas en plantas, fueron removidos y por lo tanto no fueron incorporados en la planta receptora. (Deblaere *et al.*, 1985).

Métodos de detección

Para la detección de este material en laboratorio, la empresa cuenta con técnicas de PCR para determinar la presencia del material genético insertado en estos eventos.

Para la detección a campo, se puede utilizar la característica de resistencia a herbicida incorporada en todas las construcciones, a través del pintado de hojas con herbicida o rociado de plantas.

6. Declaración sobre la existencia del impacto potencial en el medio ambiente que se pueda derivar de la liberación del organismo.

No se esperan impactos en el medio ambiente que pudieran derivar de la liberación del OGM en el sitio específico. La única modificación que ha sido introducida en estas plantas comparadas con sus contrapartes convencionales es la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Se espera que el comportamiento sea el de una planta de algodón normal (morfología, fenología, productividad, etc.).

Potencial toxicológico o alergénico de los productos de los genes introducidos

Se realizó un estudio global de homología de secuencia de aminoácidos comparando la secuencia completa de aminoácidos de la proteína PAT con todas las secuencias de proteínas presentes en las siguientes bases de datos de referencia: SwissProt, trEMBL, GeneSeq-Prot, PIR, PDB, DAD y GenPept. Estos estudios *in silico* muestran que no hay homología entre la proteína PAT y alguna toxina o alérgeno conocidos. Estudios de toxicidad oral empleando la proteína PAT en dosis de hasta 7965 mg/kg de peso corporal no ocasiona efectos adversos en ratón (Pfister *et al.*, 1996). La proteína PAT es termolábil y se degrada rápidamente, en menos de 30 segundos, bajo fluidos gástricos simulados de mamíferos (Esdaile, 2004). La proteína PAT no presenta características comunes a las proteínas alérgicas de alimentos. La comparación con las secuencias depositadas en los bancos de datos no ha mostrado similitud de significancia biológica entre la proteína PAT con alérgenos conocidos (Hérouet, 2002).

Germinación y dormancia

Una prueba de germinación de semilla comparó el efecto de la temperatura ambiente y tratamiento en frío (overnight a 0°C) en Algodón LibertyLink LLCotton25 y el control, Coker312. El análisis de los datos muestra que el tratamiento en frío de la semilla resultó en una reducción de la germinación de la línea LLCotton25 en dos de las cinco localidades, en comparación con la variedad no transgénica Coker 312. La reducción en la germinación de semillas de algodón transgénico observada con el tratamiento en frío no se ha observado en años anteriores, pero ha sido investigada en lotes de semilla posteriores así como en otros materiales genéticos y no ha sido observada nuevamente; por lo tanto puede considerarse como coincidencia. Ningún dato de germinación o vigor sugiere que el evento de transformación LLCotton25 sea menos tolerante a la baja temperatura en el campo.

Efectos en insectos no blanco del cultivo

El rasgo introducido no es una característica insecticida, ni tiene algún efecto de tolerancia a los elementos bióticos del ambiente. No hay organismos blanco, por lo tanto, la interacción del Algodón LibertyLink con organismos blanco y no blanco no es aplicable.

ALERGENICIDAD POTENCIAL

En concordancia con recomendaciones regulatorias existentes a nivel mundial, se realizaron estudios *in silico*, *in vitro*, *ex-vivo* e *in vivo* de manera de poder completar el análisis de inocuidad de la proteína PAT. Tal como fue afirmado en secciones previas, la fuente del gen *bar*, así como también el algodón, no tienen historial de propiedades alérgicas.

Homologías de Secuencias de Aminoácidos

El gen *bar* y la proteína PAT han sido completamente secuenciados. Uno de los pasos claves para evaluar la seguridad de una nueva proteína es la similitud de la secuencia de aminoácidos con toxinas o alérgenos conocidos.

La secuencia total de aminoácidos de la proteína PAT se comparó con la de toxinas y alérgenos conocidos listada en 7 bases de datos de gran extensión (SwissProt, trEMBL, GeneSeq-Prot, PIR, PDB, DAD and GenPept) (Herouet 2002). El algoritmo utilizado para la comparación de homologías fue BLASTP y la matriz de puntuación BLOSUM62. El criterio indicando toxicidad o alergenidad potencial fue 35% de identidad, en una ventana de 80 aminoácidos, con una toxina

o un alérgeno. Basándose en estos resultados *in silico*, no se encontró evidencia de ninguna similitud con proteínas tóxicas o alérgicas conocidas. Tal como se esperaba, la proteína PAT presentó solo una alta similitud estructural con otras proteínas PAT no tóxicas y no alérgicas.

Se realizó una búsqueda de homología de secuencias de epítopes para la proteína PAT, subdividida en bloques de 8 aminoácidos, con epítopes conocidos pertenecientes a alérgenos conocidos (Herouet 2002). Para esta búsqueda, también se utilizaron los algoritmos BLASTP y la matriz de puntuación BLOSUM62. El criterio indicador de potencial alérgenicidad fue una correspondencia de al menos ocho aminoácidos contiguos idénticos con un epítope alérgico conocido. No se observaron similitudes de secuencias con un epítope alérgico.

Este estudio provee una estimación sobre si la proteína PAT puede teóricamente compartir un epítope con un alérgeno conocido. La ausencia de alguna homología de secuencia de aminoácidos significativa con epítopes alérgicos conocidos lleva a la conclusión que el gen *bar* no codifica una proteína alérgica conocida o una proteína relacionada evolutivamente (homóloga).

Sitios Potenciales de Glicosilación

Muchas proteínas alérgicas están glicosiladas, dando lugar a la posibilidad que los grupos glicosilos puedan contribuir a su alérgenicidad (Jenkins, *et. al.*, 1996; Huby, *et.al.*, 2000; Pariza y Foster, 1983). Esto es –potencialmente- de particular importancia cuando se considera la alérgenicidad de proteínas en las cuales los patrones de glicosilación pueden diferir sustancialmente de sus contrapartes nativas.

El modo de glicosilación más estudiado es la formación de uniones N-glicosídicas a Asparragina en la cadena de polipéptidos. El criterio necesario (pero no suficiente) para la N-glicosilación de proteínas es la presencia de la secuencia Asparragina-Xaa-Serina/Treonina (donde Xaa representa cualquier aminoácido salvo Prolina) en la secuencia de polipéptidos. Si bien es raro, el motivo de secuencia Asparragina-Xaa-Cisteína también puede ser un sitio aceptor.

La O-Glicosilación ocurre en residuos de Serina y/o Treonina en cercanías de residuos Prolina (y con el sitio aceptor generalmente en conformación beta).

El método *in silico* permite la búsqueda de sitios potenciales de glicosilación O- y N- presentes en la proteína PAT (Herouet 2002). Los resultados muestran que en la proteína PAT codificada por el gen *bar* no se encuentran sitios potenciales de glicosilación post-traduccionales.

Estabilidad frente al Calor

Cuando se la somete a temperaturas de hasta 90°C por 10 minutos, la proteína PAT permanece detectable, luego de la migración de proteínas por método de SDS-PAGE teñido con Coomassie blue (Esdaile 2002, Bayer CropScience documento # C024585). La proteína PAT y pequeños fragmentos también permanecen detectables por western blot luego de calentar la proteína PAT a 100°C por 15 minutos (Schulz *et.al.*, 1997).

Por contraste, la inactivación enzimática de la proteína PAT se observa a temperaturas sobre 40-45°C, por 15 minutos, utilizando un estudio de espectro fotométrico de acetyl transferasa. La inactivación térmica completa ocurre luego de 10 minutos a 60°C o temperaturas superiores (Wehrmann *et.al.*, 1996).

Estos resultados muestran que la inmuno-reactividad es todavía detectable aún si la proteína PAT pierde su actividad enzimática.

Estudio de Estabilidad Proteolítica

En general, se considera más probable que aquellas proteínas alimenticias que mantienen su inmunogenicidad o su toxicidad luego de la digestión mientras que permanecen solubles y absorbibles a través del tracto intestinal pueden potencialmente despertar una reacción alérgica o tóxica, en comparación con aquellas que no son resistentes a dichos procesos (Onaderra *et.al.*, 1994; Lehrer *et.al.*, 1996; Taylor *et.al.*, 1996). Mas aún, además del hecho que se sabe que proteínas intactas son capaces de cruzar la membrana de la mucosa del intestino y entrar al sistema circulatorio (Gardner, 1988), muchos alérgenos que han sido estudiados exhiben estabilidad proteolítica (Astwood, 1996).

Por lo tanto, otro punto clave considerado cuando se evalúa la seguridad de proteínas es su estabilidad a las condiciones proteolíticas y ácidas de los sistemas digestivos (Astwood, 1996; WHO, 2000).

Digestibilidad *Ex vivo* en fluidos estomacales de cerdos y ganado

Se ha demostrado que los fluidos estomacales de cerdos inactivan rápidamente la proteína PAT (Schulz, 1993). En 1 minuto, la enzima fue totalmente inactivada (pH 1.7). La neutralización del pH del fluido estomacal moduló claramente la inactivación: 5 minutos a pH 2.4 y 3.2; 10 minutos a pH 4; más de 15 minutos a pH 5.5.

Se observó una inactivación similar de la enzima con fluido de abomaso bovino (4to estómago) y rúmen (1er estómago) (Schulz, 1993). La proteína PAT fue rápidamente inactivada por fluido de abomaso bovino. En 1 minuto, la enzima fue totalmente inactivada (pH 1.3-2.1). Cuando el pH del fluido estomacal se ajustó a valores de pH mayores, la enzima también fue inactivada, pero tomó 5 minutos (pH 3.18) y hasta 15 minutos para una inactivación casi total a pH 4. A valores de pH mayores (pH 4.9-6.37), la enzima también fue inactivada, pero tomó más de 15 minutos.

En fluido de rumen que tiene un pH casi neutral (pH 7.1), se logró una inactivación casi total luego de 30 minutos (Schulz, 1993).

Por lo tanto, la rápida degradación de la proteína PAT en jugos gástricos de cerdos y ganado es consistente con un bajo nivel de preocupación sobre su alérgenicidad y toxicidad.

Digestibilidad *In vitro* en fluidos intestinales y gástricos simulados

La estabilidad a la digestión en fluidos intestinales y gástricos simulados ha sido considerada como otro punto crucial en la evaluación de la potencial alérgenicidad, ya que se sabe que varios alérgenos son estables por hasta 24 horas en fluido gástrico simulado. Se ha utilizado de manera sistemática el método de fluido gástrico humano simulado descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos para comparar la estabilidad relativa de un número de alérgenos alimenticios comunes con proteínas alimenticias comunes seguras y con proteínas introducidas dentro de plantas (Fuchs y Astwood, 1996).

Los experimentos de digestión se llevaron a cabo de acuerdo a la hipótesis que establece que los alérgenos alimenticios deben exhibir suficiente estabilidad gástrica (al menos 15 minutos) de manera tal de tener la posibilidad de llegar a la mucosa intestinal donde ocurre la absorción y la sensibilización. Se incubaron soluciones conteniendo proteína PAT con fluidos gástricos simulados (SGF) y fluidos intestinales simulados (SIF) por distintos periodos de tiempo y luego se analizaron por SDS-PAGE seguido por western blot (Schulz, *et.al.*, 1997). Las proteínas PAT fueron rápida y fácilmente digeridas por los fluidos intestinales y gástricos. Debido a que la degradación es causada por la presencia de proteasas presentes en los fluidos digestivos (pepsina en fluido gástrico y pancreatina en el fluido intestinal), PAT quedó parcialmente intacta cuando las proteasas se omitieron de los fluidos. La rapidísima degradación e inactivación de la proteína PAT en fluidos simulados sustenta la ausencia de potencial alérgico o tóxico de las proteínas PAT.

Otro estudio demostró que la proteína PAT dejó de ser detectable por un análisis de SDS-PAGE teñido con plata luego de unos pocos segundos de incubación en fluido gástrico humano simulado (Wehrmann *et.al.*, 1996). Este estudio también confirmó que cuando se omite la pepsina, no ocurre degradación de la proteína PAT.

Además, un ensayo de actividad acetyl transferasa mostró que la actividad enzimática cae a cero dentro de los 5-15 segundos de tiempo (Wehrmann *et.al.*, 1996), sustentando la evidencia de ausencia de alergenicidad y toxicidad de la proteína PAT. Sin pepsina, la actividad PAT disminuyó indicando que un bajo pH es suficiente para inactivar las enzimas PAT.

Estudios recientes obtenidos en condiciones experimentales idénticas al método utilizado por el ring trial del ILSI (Thomas *et al.*, 2004), bajo condiciones GLP, confirmaron la rápida degradación de la proteína PAT (dentro de los 30 segundos) en fluido gástrico simulado (pH 2 y 1.2), en presencia de pepsina (Rouquie 2005). Nuevamente, la degradación es causada por la pepsina presente en el FGS.

Mas aún, resultados obtenidos con un método similar acoplado a un Western blot, bajo condiciones GLP, mostró la rápida degradación de la proteína PAT (en segundos) en fluido intestinal simulado (pH 7.5), en presencia de pancreatina (Esdaile 2002). Los restantes fragmentos de 7 Kdal desaparecieron completamente luego de una incubación corta de 5 min. Nuevamente, la degradación está unida a la presencia de pancreatina en el FIS.

Combinados con los experimentos previos, estos experimentos de digestión *in vitro* demuestran que la proteína PAT codificada por el gen *bar* tiene una estabilidad estructural y funcional extremadamente corta bajo condiciones gástricas e intestinales simuladas. Estos resultados confirman la seguridad de la proteína PAT para el consumo por parte del hombre o los animales debido a que la rápida degradación de la proteína PAT minimiza en gran medida la posibilidad que esta proteína pudiera sobrevivir en el tracto digestivo y ser absorbida.

Estudio de Toxicidad Intravenosa Aguda en Ratón

Con el objetivo de tener una evaluación directa de la toxicidad de la proteína, se consideró que un estudio agudo era el mas apropiado, ya que se sabe que las proteínas son toxicas vía mecanismos agudos (Pariza y Foster, 1983; Jones y Maryanski, 1991; Sjoblad *et.al.*, 1992).

En este estudio, la proteína PAT (codificada por el gen *bar*) se produjo en *E. coli* y fue ampliamente purificada (>95%) de manera tal de evitar la presencia de impurezas resultantes del proceso de aislamiento enzimático (ej., lipopolysacaridos)

Se condujo un estudio de toxicidad intravenosa aguda en ratón (Kennel 2002). Se administró, a grupos de 5 ratones, proteína PAT, aprotinina (control negativo) o melittina (control positivo) a dosis con niveles de 1 y 10 mg/kg de peso corporal. Se observaron diariamente los síntomas clínicos de todos los animales mientras que sus pesos corporales se medían semanalmente. Al final del estudio, se realizó una necropsia de los animales, la cual incluyó una examinación macroscópica. Los resultados mostraron que los animales tratados con la proteína PAT y la aprotinina a 10 mg/kg no tuvieron signos visibles de toxicidad sistémica, en contraste con la melittina, la cual induce una mortalidad del 100% dentro de los 10 minutos a la misma dosis.

Estudio de Toxicidad Oral Subcrónica en Ratas

La potencial toxicidad de la proteína PAT fue testada aún más en un estudio de toxicidad oral de dosis repetidas en ratas (Pfister *et.al.*, 1996). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las OECD Test Guideline 407 « Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents » (1995). Debido a que la proteína PAT está compuesta por aminoácidos normales, no se esperaba que causara ninguna toxicidad notable. Por lo tanto, se consideró suficiente un período de tratamiento de 14 días. Se midieron todos los parámetros inmunológicos de control, incluidos en el año 1995 en la guía de Ensayo posterior de la OECD.

Luego de la administración reiterada de la proteína PAT por vía oral en ratas, se vio que la misma carecía de algún efecto medible en términos de consumo alimenticio, ganancia de peso, mortalidad o necropsia. Hasta niveles tan altos como 7619 mg/kg peso corporal/día en machos y

7965 mg/kg peso corporal/día en hembras, las proteínas PAT no causaron ningún efecto adverso durante el período de 14 días.

En resumen, la siguiente información acumulada de acuerdo a las metodologías actuales, provee una clara evidencia de que la proteína PAT codificada por el gen *bar* no posee propiedades tóxicas o alergénicas:

- *Streptomyces hygrosopicus*, el organismo donante, es una bacteria saprofítica segura y común del suelo sin ninguna evidencia de efectos patogénicos, tóxicos o alergénicos para humanos y animales.
- El gen *bar* es equivalente a cualquier ADN de componentes alimenticios conocidos que han sido siempre consumidos como parte de la dieta humana o animal.
- La proteína PAT no tiene similitud de secuencias de aminoácidos con toxinas o alérgenos conocidos. Tal como era esperable, la proteína PAT solo tiene una alta similitud estructural con proteínas fosfinotricin acetyl transferasas no tóxicas y no alérgicas.
- La proteína PAT no posee sitios de N- y O-glicosilación presentes comúnmente en alérgenos.
- La proteína PAT tiene un rol bioquímico en plantas muy bien comprendido y los efectos metabólicos de su expresión se limitan a conferir tolerancia al herbicida Liberty.
- La actividad de la proteína PAT es cero a temperaturas menores a 10°C o mayores de 40-45°C, y baja a otras temperaturas.
- La proteína PAT no es estable en un ambiente ácido. Es rápidamente degradada (dentro del minuto) e inactivada en fluidos estomacales de ganado y cerdos. También es rápida y completamente degradada en fluidos intestinales y gástricos simulados de mamíferos (entre pocos segundos y 5 minutos).
- La proteína PAT no posee ningún efecto adverso en ratón, aún a dosis de niveles tan altos como 10 mg/ml administrados en una sola dosis intravenosa.
- La proteína PAT no posee ningún efecto tóxico en ratas, aún a dosis extremadamente altas (7619 mg/kg peso corporal/día en machos y 7965 mg/kg peso corporal /día en hembras), luego de administración repetida por mezcla en la dieta durante un período de 14 días.
- La proteína PAT es una enzima altamente específica y comparte la estructura de 2-dimensiones, inmutabilidad, peso molecular y propiedades funcionales con proteínas no alérgicas y no tóxicas pertenecientes a la clase segura de proteínas acetyl transferasas.

En conclusión, se considera que el gen *bar*, el organismo donante *Streptomyces* y la proteína PAT no son patogénicas o tóxicas para mamíferos y no poseen ninguna de las características de los alérgenos. Por lo tanto, no se esperan efectos sobre la salud humana o animal debido al consumo del gen *bar* y/o la proteína PAT.

Efectos intencionales y no intencionales que pudieran generar estas plantas comparadas con sus contrapartes convencionales

El nuevo rasgo permite a las plantas de algodón sobrevivir a aplicaciones de glufosinato de amonio. Bajo presión de selección en un área tratada con glufosinato de amonio, el Algodón LibertyLink puede establecerse en el ambiente y, por lo tanto, modificar la biodiversidad. Además, se podría transferir la característica vía polen a otros algodones cultivados en las proximidades y contribuir a su establecimiento y modificación de la biodiversidad. Sin embargo, esto sería posible sólo si dichas plantas tuvieran una ventaja selectiva sobre otras, para lo que se requeriría una constante presión de selección mediante aplicaciones de glufosinato de amonio, lo que no ocurriría naturalmente.

Potencial de transferencia del gen

En el punto 2 de este apartado se presenta información sobre el potencial de polinización cruzada del evento. También se ha elaborado un estudio de la flora circundante en la finca donde se realizarán los ensayos. Hasta la fecha, no se han encontrado plantas con potencial de cruzamiento con el algodón en las áreas cercanas a los sitios donde se ubicarán los ensayos.

El riesgo de transferencia horizontal, intra o interespecífica es mínimo. Además, se han tomado medidas adicionales para prevenir esta ocurrencia, como labores culturales de control de plantas voluntarias y ausencia de plantas receptoras compatibles en las áreas cercanas al ensayo (malezas compatibles), así como reforzamiento de barreras vegetativas.

Aplicación del herbicida

El tratamiento con herbicida recomendado para el algodón LibertyLink es: dos aplicaciones de glufosinato de amonio a 600 gramos de ingrediente activo por hectárea en el estado de 3 a 5 hojas y 20% de floración.

Estudios en las regiones algodoneras de los Estados Unidos han evaluado la efectividad del herbicida Liberty contra las malezas más importantes en algodón. Los resultados han demostrado un control aceptable sobre cada una de ellas. El uso del herbicida Liberty encaja bien con las nuevas prácticas agronómicas comunes para el control de malezas en el algodón. Estas incluyen menos labranza, menos combinaciones de herbicidas preemergentes y el mayor uso de herbicidas de amplio espectro post-emergentes. La opción de esperar el establecimiento del cultivo para evaluar la infestación de malezas y la necesidad de control de malezas, proporciona flexibilidad al productor y evita la aplicación innecesaria de herbicidas pre-cultivo y pre-emergentes. El herbicida Liberty y por lo tanto el algodón LibertyLink, permite al agricultor la opción de retrasar la aplicación de herbicidas hasta que el nivel de infestación de malezas sea conocido. El modo único de acción del Liberty se presta a sí mismo como una herramienta excelente de rotación de herbicidas para prevenir resistencia y la necesidad de nuevos sistemas de manejo de malezas.

7. Debe señalarse detalladamente el diseño experimental propuesto para la liberación al medio ambiente y sistema de producción

Información disponible en el registro de este evento.

8. Cantidad total del organismo vivo modificado genéticamente que se va a liberar y que cantidad se utilizará para cada ensayo en caso de que se establezcan varios. Elaborar un calendario en el que se indiquen las prácticas agronómicas (p.e. siembra, transplante) y ensayos propuestos.

Información disponible en el registro de este evento.

9. Anexar un mapa del sitio del ensayo indicando localización geográfica y la localidad exacta donde se establecen los ensayos del organismo vivo modificado, tomando en cuenta lo siguiente:

- ✓ *Cuando varias construcciones genéticas sean probadas en diferentes localidades, indicar cuales construcciones son probadas para cada sitio.*
- ✓ *Cuando varios ensayos son aplicados para la misma localización, indicar la localidad específica para cada ensayo.*
- ✓ *Describir los usos que ha tenido o tienen los terrenos aledaños y el lugar donde se establecen los ensayos. En caso de organismos vivos modificados anexar un listado y descripción de las plantas tanto silvestres como cultivadas filogenéticamente relacionadas a la planta que pudiera ser receptores de polen transgénico.*
- ✓ *Especificar cuales son las dimensiones y área que ocupan los ensayos (no incluyendo bordes e hileras de material no modificado genéticamente). Así como descripción de los lugares de distribución del organismo vivo modificado (p.e. invernadero, laboratorio, cámaras de crecimiento).*

Información disponible en el registro de este evento.

10. Detallar los procedimientos y medidas de bioseguridad que se usarán para prevenir la contaminación, escape y diseminación sin control del producto.

Durante todo el proceso, personal de Bayer mantendrá una estricta supervisión, a la vez se procederá a capacitar a los trabajadores y otros involucrados para que estos velen por las medidas de seguridad necesarias.

Todo el material que se importe será sembrado en los campos que para ese fin se escogieron, en el caso de eliminar plantas estas serán desvitalizadas por labranza, herbicida o por eliminación manual, recogidas en sacos de polipropileno e incineradas en el mismo campo donde se plantó.

Todo el material cosechado será transportado en sacos de polipropileno cerrados desde el campo, contenidos estos en un vagón (trailer) o camión totalmente cerrados, los cuales serán escoltados por otro vehículo donde sus ocupantes velarán por evitar una diseminación.

Todos los tractores e implementos que ingresen en el campo serán profundamente limpiados antes y después de ingresar al campo, será rutinaria la inspección de estos equipos.

11. Descripción detallada del método propuesto de disposición final del organismo vivo modificado al término del experimento, así como la disposición final o limpieza de otros materiales que hayan tenido contacto con el material transgénico durante el ensayo.

Toda la semilla cosechada será exportada hacia Los Estados Unidos y los rastrojos serán destruidos. Durante la estación lluviosa los campos permanecerán en barbecho o con arroz, donde se les mantendrá roturados eliminando así las plantas voluntarias, si las condiciones del tiempo no permiten roturar se procederá a controlar plantas voluntarias con aplicaciones de herbicidas hormonales o mediante control manual.

Todos los equipos que ingresen en los campos plantados serán limpiados antes de abandonar estos campos. Para esto el personal de Bayer establecerá un sistema de inspección de equipos y se mantendrán capacitaciones periódicas en Bioseguridad al personal involucrado.

El personal que trabaje con ese material estará previamente capacitado por personal debidamente autorizado por el Programa de Biotecnología, con la actualización de los protocolos de bioseguridad de la compañía.

12. Historial de liberaciones anteriores, indicando: lugar, número de permiso y fecha de autorización

Actualmente, el evento de transformación LLCotton25 es un evento comercial y por lo tanto no requiere permisos en Estados Unidos para plantación. Durante su desarrollo, el evento de transformación LLCotton25 fue evaluado en campo por Bayer CropScience (ex Aventis CropScience) en producción de invierno y en todas las regiones de adaptación en los Estados Unidos. Estos ensayos se realizaron en más de 40 lugares bajo autorizaciones de liberación al medio otorgadas por USDA APHIS desde 1999. Fuera de Estados Unidos, el evento LLCotton25 de algodón LibertyLink fue ensayado en campo en producciones de mejoramiento en Australia, Brasil, Guatemala, Mexico y en Sud Africa.

En todos los sitios de liberación, las plantas de algodón se observaron desde su emergencia hasta madurez. No se observaron diferencias entre las plantas de algodón transgénicas y no transgénicas en emergencia, vigor de plántulas, establecimiento de plantas y madurez. Durante la estación de crecimiento se realizaron observaciones al menos cuatro veces; 1) emergencia, 2) pre-floración, 3) floración y 4) estado de bocha.

A continuación se provee un resumen de las Aprobaciones Regulatorias para la liberación al ambiente del algodón LLCotton25 en varios países:

LUGAR	PERMISO	FECHA DE AUTORIZACIÓN
Australia	DIR 062-2005	2006
Estados Unidos	BNF86	2003
Brasil	1521-2008	2008

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Donia M.B. 1989. Gossypol. *In Toxicants of Plant Origin - Volume IV Phenolics* (P.R. Cheeke, ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 1-22.
- Anonymous (1991). Glufosinate-ammonium. Information on the active ingredient. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, Germany. 23 pp.
- Astwood, J.D. 1996. Stability Of Food Allergens To Digestion *In Vitro*. *Nature Biotechnology*. 14:1269-73.
- Bartsch, K. and C. Tebbe, 1989. Initial steps in the degradation of phosphinotricin (glufosinate) by soil bacterial. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (3) 711-716.
- Bayer, E., Gugel, K.H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W.A., Zähler, H. 1972. Phosphinothricin And Phosphinothricyl-Alanyl-Alanine. *Helvetica Chimica Acta*. 55:224-39.
- Bell A.A. 1986. Physiology of secondary products. *In Cotton Physiology* (Mauney, J.R. and Steward, J. McD., eds.). The Cotton Foundation Reference Book Series, Memphis, TN. 597-621.
- Berardi L.C., Goldblatt L.A. 1980. Gossypol. *In Toxic constituents of plant foodstuffs*. 2nd Ed., I.I. Liener, ed., Academic Press, New York. 183-237.
- Berberich S.A., Ream J.E, Jackson T.L., Wood R., Stipanovic R., Harvey P., Patzer S., Fuchs, R.L. 1996. "The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed", *J. Agric. Food Chem.* 44. 365-371.
- Berghman S. 2004. Description of vector pGSV71 (*Gossypium hirsutum*), Bayer CropScience document. #C046182.
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W., Crosa J., Falkow S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2. 95-113.
- Bressani, R. 1965. The use of Cottonseed protein in Human Foods. *Food Technology*: 51-58.
- Bressani, R. 1967. High protein quality vegetable mixtures for human feeding. Instituto de Nutrición de Centro America y Panama (INCAP). 1-10.
- Calhoun M, Holmberg C. 1991. Safe use of cotton by-products as feed ingredients for ruminants : a review. *In Cattle Research with Gossypol Containing Feeds*. (Jones L.A., Kinard D.H. and Mills J.S., eds.). Memphis, TN, National Cottonseed Products Association. 97-127.
- Calhoun M.C., Kuhlmann S.W., Baldwin B.C. 1995. Cotton feed composition and gossypol availability and toxicity. *In Proc. 2nd National Alternative Feeds Symp.*, Wooster, OH, Sept. 24-26, 1995. 125-145.

- Cherry J.P. 1983. Cottonseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60. 312-319.
- Cherry J.P., Leffler H.R. 1984. Seed. In *Cotton* (Kohel, R.J. and Lewis, C.F., eds.) Amer. Soc. Agron. Madison, WI. 511-558.
- Cornelissen M., Vandewiele M. 1989. Nuclear transcriptional activity of the tobacco plastid psbA promoter. *Nucleic Acids Research.* 17. 19-29.
- Cotton Incorporated, 2000a. - Cottonseed terminology can be confusing In 1999-2000 Cottonseed Sourcebook Page 5, www.cottoninc.com. Cotton Incorporated, Cary, NC27513.
- Cotton Incorporated. 2000b. Whole cottonseed: a super feed for dairy cows. In *Agricultural Research, Cottonseed Marketing.* 2000 Digital Edition, www.cottoninc.com. Cotton Incorporated, Cary, NC27513.
- Crockett L. 1977. *Wildly Successful Plants: North American Weeds.* University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii.
- Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. 1985. Efficient octopine Ti-plasmid derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research.* 13. 4777-4788.
- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva Rao N., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. 1987. Engineering Herbicide Resistance In Plants By Expression Of A Detoxifying Enzyme. *EMBO J.*:6. 2513-2518.
- Demain A.L., Aharonowitz Y., Martin J.-F. 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics* (Vining L.C., ed.). Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Massachusetts. pp. 49-72.
- Depicker A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P., Goodman H.M. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Molec. Appl. Genet.* 1. 561-573.
- Endrizzi J.E., Turcotte E.I., Kohel R.J. 1984. Cotton, *Agronomy No. 24*, p 82-129, Soil Science Society of America, Inc. (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds.) Wisconsin, USA.
- Ensminger A.H., Ensminger M.E., Konlande J.E., Robson, J.R.K. 1994. *Foods and Nutrition Encyclopedia.* 2nd ed. Ann Harbor, MI. 1. 497-507.
- Esdaile, D. J. 2002. Phosphinothricin acetyltransferase (PAT)- bar gene product. Heat stability study, Bayer CropScience document # C024585.
- Esdaile, D. J. 2002. Phosphinothricin AcetylTransferase (PAT)- bar gene product In vitro digestibility test in simulated intestinal fluid. Bayer CropScience document # C025156.
- FAO/WHO. 1999. Codex Alimentarius Commission on Fats and Oils (Cottonseed oil).
- FAO/WHO. Evaluation Of Allergenicity Of Genetically Modified Foods Report Of A Joint FAO/WHO Expert Consultation On Allergenicity Of Foods Derived From Biotechnology, Rome, Italy, 22-25 January 2001.
- Forster L.A. Jr., Calhoun, M.C. 1995. Nutrient values for cottonseed products deserve new look. *Feedstuffs* 67 (44). 1-5.
- Frank A.W.. 1989. Food uses of cottonseed protein. *Developments in Food proteins - 5.* New York. 31-80.
- Fryxell P.A. 1976. *The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae),* Texas A&M University Press. College Station and London.

- Fryxell P.A. 1984. Cotton, *Agronomy* No. 24, p 82-129, Soil Science Society of America, Inc., (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds) Wisconsin, USA.
- Fuchs R.L., Aswood J.D. .1996. Allergenicity Assessment Of Foods Derived From Genetically Modified Plants. *Food Tech.* 83-88.
- Gardner M.L.G. 1988. Gastrointestinal Absorption Of Intact Proteins. *Ann. Rev. Nutr.* 8. 329-350.
- Gielen J. De Beuckeleer M., Seurinck J. Deboeck F., De Greve H., Lemmers M., Van Montagu M., Schell J. 1984. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3. 835-846.
- Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B. 1994. In *The Lipid Handbook*, 2nd Edition (Chapman & al., eds.) London. University Press, Cambridge. pp. 13-14, 47-146.
- Hara O., Murakami T., Imai S., Anzai H., Itoh R., Kumada Y., Takano E., Satoh E., Satoh A., Nagaoka K., Thompson C. 1991. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces viridochromogenes*: cloning, heterospecific expression, and comparison with the genes of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Gen. Microbiol.* 137. 351-359.
- Harpster M.H., Townsend J.A., Jones J.D.G., Bedbrook J., Dunsmuir P. 1988. Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus, '1,2', and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Mol. Gen. Genet.* 212. 182-190.
- Herouet, C. 2002. Phosphinothricine AcetylTransferase (PAT)- bar gene product. Epitope homology and glycosylation searches. Bayer CropScience document # C024490.
- Herouet, C. 2002. Phosphinothricin AcetylTransferase (PAT)- bar gene product. Overall amino acid sequence homology search with known toxins and allergens, Bayer CropScience document # C024579.
- Holm, L., Pancho, J.V., Herberger, J.P., Plucknett, D.L. (1979) *A Geographical Atlas of World Weeds*. John Wiley and Sons, NY. 391 pp.
- Huby R.D.J., Dearman R.J., Kimber I. 2000. Why Are Some Proteins Allergens? *Toxicol. Sc.* 55. 235-246.
- Itoh Y. Watson J.M., Haas D., Leisinger T. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid.* 11. 206-220.
- Jenkins J.N. 1993. Cotton. In *Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology*. OECD.
- Jenkins N., Parekh R.B., James D.C. 1996. Getting The Glycosylation Right: Implications For The Biotechnology Industry. *Nat. Biotechnol.* 14. 975-981.
- Jones L.A. 1987. Recent advances in using cottonseed products. In *Proc. Florida Nutrition Conference*, March 12-13, 1987. Daytona Beach, Florida. 119-138.
- Jones, L.A., King CC. 1993. Cottonseed oil. National Cottonseed Products Association, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis, TN.
- Jones, D.D., Maryanski, J.H. Safety Considerations In The Evaluation Of Transgenic Plants For Human Foods. In Levin, M.A., Strauss, H.S., Eds. *Risk Assessment In Genetic Engineering*. New York, McGraw-Hill, 1991. 64-82.
- Kareiva P., Morris W., Jacobi C. 1994. Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and their wild relatives. *Molec. Ecology.* 3. 15-21.

- Kennel P. 2002. PAT (Phosphinothricin Acetyltransferase) protein derived from bar gene Acute toxicity by intravenous injection in the mouse, Aventis CropScience document # C025883.
- Kumada Y., Anzai H., Takano E., Murakami T., Hara O., Itoh R., Imai, S., Satoh A., Nagaoka K. 1988. The bialaphos resistance gene (bar) plays a role in both self-defense and bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiotics* 41. 1838-1845.
- Lawhon J.T., Cater C.M., Mattil K.F. 1977. Evaluation of the food use potential of sixteen varieties of cottonseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54. 75-80. Abstract.
- Lehrer, S.B., Horner, W.E., Resse, G. 1996. Why Are Some Proteins Allergenic? Implications For Biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 36:553-564.
- Liener I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 34. 31-67.
- Lundquist R. 1995. Current Uses of Traditional Co-Products. Wooster, OH: September 24-26. Proceedings of the 2nd National Alternative Feeds Symposium. 95-104.
- McGregor S.E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants, Agricultural Handbook No. 496, Unites States Department of Agriculture Research Service, Washington, DC.
- Meredith W.R., Bridge R.R. 1973. Natural crossing in cotton *Gossypium hirsutum* L. in the delta of Mississippi. *Crop Sci.* 13. 551-552.
- Metzer R.M., Supak J.R. 1990. Characteristics of Cotton Varieties Grown in Texas. Third Edition. Texas Agricultural Extension Service B1312. p. 34.
- Mifflin B.J, Lea, P.J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem.* 15. 873-885.
- Muenschler W.C. 1980. Weeds. Second Edition. Cornell University Press, Ithaca and London.
- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Sathah, A., Nagaoka, K., Thompson, C.J. 1986. The Bialaphos Biosynthetic Genes Of *Streptomyces Hygroscopicus*: Molecular Cloning And Characterization Of The Gene Cluster. *Molec. Gen. Genet.* 205:42-50.
- NCCA, 1999 - National Cotton Council of America. Cotton: from field to fabric. Educational Materials.).
- NCPA, 1999 - National Cottonseed Products Association. Cottonseed and its Products. CSIP 10th Edition. 1999 Digital Edition. www.cottonseed.com. National Cottonseed Products Association, Inc. P.O. Box 172267. Memphis, TN 38187.
- NCPA, 2000a. - National Cottonseed Products Association. Cottonseed Oil. CSO Bulletin. 2000 Digital Edition. www.cottonseed.com. National Cottonseed Products Association, Inc. P.O. Box 172267. Memphis, TN 38187-2267.
- NCPA, 2000b. - National Cottonseed Products Association. Cottonseed Feed Products Guide. 2000 Digital Edition. www.cottonseed.com. National Cottonseed Products Association, Inc. P.O. Box 172267. Memphis, TN 38187-2267.
- NCPA, 2000c. - National Cottonseed Products Association. Cottonseed. Inform. National Cottonseed Products Association. 1255 Lynfield Road, Suite 143. Memphis, TN 38119 (AOCS Press). Vol. 11. August 2000. 820-839.
- Nida D.L., Patzer S., Harvey P., Stipanovic R., Wood R., Fuchs, R.L. 1996. Glyphosate-tolerant cotton: the composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. *J. Agric. Food Chem.* 44. 1967-1974.

- Niles G.A., Feaster, C.V. 1984. Cotton, *Agronomy* No. 24, p 205, Soil Science Society of America, Inc., (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds). Wisconsin, USA
- Odell J.T., Nagy F., Chua, N-H. 1985. Identification of DNA Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter. *Nature*. 313. 810-812.
- Onaderra, M., Monslave, R.I., Mancheno, J.M., Villalba, M., Martinez Del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rodriguez, R. 1994. Food Mustard Allergen Interaction With Phospholipid Vesicles. *Eur. J. Biochem.* 225:609-15.
- Pariza, M.W., Foster, E.M. 1983. Determining The Safety Of Enzymes Used In Food Processing. *J. Food Protect.* 46:453-68.
- Pfister T., Schmid, H., Luetkemeier, H., Biedermann, K., Weber, K. 1996. PAT-protein- repeated dose oral toxicity (14-day feeding) study in rats, Research and Consulting Company Ltd, document # A57935.
- Phelps R.A., Shenstone F.S., Kemmerer R.J., Evans, R.J. 1965. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. *Poult. Sci.* 44. 358-394.
- Poehlman, Milton; Sleper, J. 1995. *Breeding field crops*. Fourth Edition. Iowa State University Press/ Ames. USA.)
- Rouquie D. 2005. Phosphinothricin acetyltransferase (PAT) bar gene product. In vitro digestibility in simulated gastric fluid, Bayer CropScience document #M-217195-03-01.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schulz A. 1993. L-Phosphinothricin N-Acetyltransferase- Inactivation By Pig And Cattle Gastric Juice, Hoechst Aktiengesellschaft Document # A51230.
- Schulz, A., Lütge, K., Taggeselle, P. 1997. Stability Of The Phosphinothricin Acetyltransferase Enzyme: Heat Stability And Digestion In Simulated Gastric Fluid And Simulated Intestinal Fluid, Agrevo Document # A58686.
- Sundstrom F.J. 2001. Pollen Transfer in Cottonseed Production In The Biotech Evolution of the Seed Industry: Adventitious Presence, Quality Assurance and Orderly Marketing. Rosemont, IL, April 9. *Proceedings*. 31-36.
- Sjogblad, R., McClintock, J.T., Engler, R. 1992. Toxicological Considerations For Protein Components Of Biological Pesticide Products. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15:3-9.
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizuwa Y., Takematsu T. 1986. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pesticide Sci.* 11. 33-37.
- Taylor, S., Lehrer, S.B. 1996. Principles And Characteristics Of Food Allergens. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 36:S91-S118.
- Thomas K., Aalbers M., Bannon G.A., Bartels M., Dearman R.J., Esdaile D.J., Fu T.J., Glatt C.M., Hadfield N., Hatzos C., Hefle S.L., Heylings J.R., Goodman R.E., Henry B., Hérouet C., Holsapple M., Ladics G.S., Landry T.D., MacIntosh S.C., Rice E.A., Privalle L.S., Steiner H.Y., Teshima R., Thomas K., van Ree R., Woolhiser M., Zawodny J. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Reg. Tox. Pharma.*, 39, pp. 87-98
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J. 1987. Characterization Of The Herbicide-Resistance Gene Bar From *Streptomyces Hygroscopicus*. *Embo J.* 6:2519-23.

- USDA, 2001. Composition of Foods Raw, Processed, Prepared. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 14. July 2001.
- Vaissière B. 1990. Pollen dispersal and carryover in Upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. Study report for the Department of Entomology, Texas A & M University, College Station, TX. USA.
- Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort R.A., Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature* 252. 169-170. #A67242.
- Watkins S.E., Waldroup P.W. 1995. Utilization of high protein cottonseed meal in broiler diets. *J. Appl. Poultry Res.* 4. 310-318.
- Webb E.C. 1992. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, New York. 178-199.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A. 1996. The Similarities Of Bar And Pat Gene Products Make Them Equally Applicable For Plant Engineers. *Nature Biotechnology*. 14:1274-8.
- World Health Organization. 2000. Report Of A Joint Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO) Expert Consultation On Foods Derived From Biotechnology.
- Wood R. 1986. Comparison of the cyclopropene fatty acid content of cottonseed varieties, glanded and glandless seeds and various seed structures. *Biochemical Archives* 2:73-80.
- Wozenski J., Woodburn, M. 1975. Phytic acid (myoinositol hexaphosphate) and phytase activity in four cottonseed protein products. *Cereal Chemistry* 52. 665-669.
- Xin, Z.Y., Brettell, R.I.S., Cheng, Z.M., Waterhouse, P.M., Appels, R., Banks, P.M., Zhou, G.H., Chen, X., Larkin, P.J. 1988. Characterization of a potential source of barley yellow dwarf virus resistance for wheat. *Genome*. 30: 250-257.
- Zambryski P. 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Ann. Rev. Genet.* 22: 1-30.