

**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**

|                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                |                                                                                                                                   |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>1. Nombre y dirección de la empresa o institución solicitante:</b><br><b>BAYER CENTRAL AMERICA, S.A.</b><br>Edificio Eurocenter II, 5to Piso. 400 m E del Mall Real Cariari, Barreal de Heredia (frente a CENADA).                 |                                                                                                                                |                                                                                                                                   |                                  |
| <b>2. Teléfono:</b> 2589-8900                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                | <b>Fax:</b> 2589-8999                                                                                                             |                                  |
| <b>3. TIPO DE ACTIVIDAD REQUERIDA</b><br>Movilización<br><input checked="" type="checkbox"/> Importación<br>Liberación al medio ambiente<br>Importación y liberación<br><input checked="" type="checkbox"/> Movilización y liberación |                                                                                                                                | <b>4. ESTA SOLICITUD ES:</b><br>Nueva<br><input checked="" type="checkbox"/> Extensión<br>Suplementaria                           |                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                | <b>5. MEDIOS DE MOVILIZACION</b><br>Correo<br>Equipaje de mano<br><input checked="" type="checkbox"/> Otro, especifique:<br>Aéreo |                                  |
| <b>6. COMPLETAR</b>                                                                                                                                                                                                                   | Nombre Científico                                                                                                              | Nombre común                                                                                                                      | Nombre comercial                 |
| a. Organismo donador:                                                                                                                                                                                                                 | <i>Bacillus thuringiensis</i>                                                                                                  | <i>Bt</i>                                                                                                                         |                                  |
| b. Organismo receptor:                                                                                                                                                                                                                | <i>Gossypium hirsutum</i>                                                                                                      | Algodón                                                                                                                           |                                  |
| c. Agente vector o vectores:                                                                                                                                                                                                          | Se transformó mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                                                                        | Agrobacterium                                                                                                                     |                                  |
| d. Organismo vivo modificado (transgénico)                                                                                                                                                                                            | <i>Gossypium hirsutum</i>                                                                                                      | Algodón                                                                                                                           | <b>Algodón Glytol Cotton BCS</b> |
| <b>7. CANTIDAD TOTAL DEL ORGANISMO VIVO MODIFICADO</b><br>Importador: <u>Bayer Central America, S. A.</u><br>Liberar: _____<br>Itinerario propuesto: _____<br>N° introducciones: _____                                                |                                                                                                                                | <b>8. FECHA DE IMPORTACION O MOVILIZACION</b><br><br>Aeropuerto Juan Santamaría                                                   |                                  |
| <b>9. PAIS DE ORIGEN DEL ORGANISMO VIVO MODIFICADO</b><br>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA                                                                                                                                                   |                                                                                                                                | <b>10. DESTINO FINAL DE LA IMPORTACION, MOVILIZACION O LIBERACION</b><br>Liberia-Guanacaste                                       |                                  |
| <b>11. ADJUNTO LA INFORMACION QUE COMPLETA LA PRESENTE SOLICITUD:</b>                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                |                                                                                                                                   |                                  |
| <b>12. FIRMA DEL RESPONSABLE</b>                                                                                                                                                                                                      | <b>13. NOMBRE Y CARGO QUE OCUPA EN LA EMPRESA</b><br>Erwin Gamboa Segura<br>Especialista en Asuntos Regulatorios y Operaciones |                                                                                                                                   | <b>14. FECHA</b>                 |

PARA SER LLENADO POR LA DIRECCION DE SERVICIOS DE PROTECCION FITOSANITARIA

|                                                     |                                                                         |                                            |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Información completa:<br>Si                      No | Fecha de recepción de la solicitud:                                     | Fecha de inicio del análisis de solicitud: |
| Fecha de expiración:                                | Certificado y/o requisitos fitosanitarios<br>Si                      No | Firma de la DSPF                           |

## 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

Residencias Piedra y Navarro, Casa No. 3, 25 m N. del Puente sobre Río Seco, Los Ángeles, Cartago.

Tel. 8932-2770, céd 1-949-744

**Responsable Legal:**

Omar Arias López

Del Final del Boulevard de Rohrmoser 500 mts. Norte,

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).

**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

**Omar Arias López, Gerente Técnico Regional CA & C**

Del Final del Boulevard de Rohrmoser 500 mts. Norte,

Tel. 88210889

Compañía contratada para la producción de semillas

Compañía:

Semillas Olson

Responsable Legal:

James Olson

Responsable Técnico:

Adam Olson

Teléfonos:

2665-1671

e-mail:

aolson@semolson.com

Responsable de Bayer a contactar en caso de accidente o imprevisto:

Erwin Gamboa, Oficinas Centrales Bayer. Tel. 8932-2770 / 2589-8962

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

**EL GEN 2m epsps**

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 -Steve Hague  
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

**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.**

|                           | <u>Nombre Científico</u>         | <u>Nombre Común</u>       |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| a. Organismo donador      | <i>Zea mays</i>                  | Maíz                      |
| b. Organismo receptor     | <i>Gossypium hirsutum</i>        | Algodón                   |
| c. Vector o agente vector | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Agrobacterium             |
| d. Organismo regulado     | <i>Gossypium hirsutum</i>        | Algodón Glytol Cotton BCS |

El "número único de identificación de organismos transgénicos", según la guía emitida por la OECD, es el **BCS-GHØØ2-5**.

## **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 ESPECIFICA 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 África o Asia y se les conoce como especies del Viejo Mundo, las cuales están estrechamente relacionadas. Las especies diploides con los genomas **C** o **G** son originarias de Australia. Las especies diploides que contienen el genoma **D** son originarias del hemisferio occidental y se les conoce como especies del Nuevo Mundo. Los cromosomas en el genoma **D** son más pequeños que los cromosomas de los otros genomas (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 algodonnero 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 msn, 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.**

#### **Organismo donador**

El organismo donante de la secuencia del gen 2mepsps fue el maíz (*Zea mays* L.). El mismo fue generado a través de la introducción de dos mutaciones puntuales en el gen de tipo silvestre epsps (wtepsps) clonado de maíz (*Zea mays* L.) utilizando técnicas in vitro. Estos cambios al gen dieron como resultado la producción de una proteína EPSPS doble mutante (2mEPSPS) que tiene menor afinidad de unión por el glifosato, permitiendo así una suficiente actividad enzimática para que la planta crezca de manera normal en presencia del este herbicida.

#### **Organismo vector**

Las líneas de algodón Glytol Cotton BCS fueron obtenidas utilizando el sistema de transformación genética mediado por *Agrobacterium*, usando una cepa inhabilitada para infección (desarmada) que contiene una copia simple de T-DNA.

#### **El organismo receptor**

La línea parental de Glytol cotton BCS 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 Glytol Cotton BCS 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.

Coker 312 es una variedad común encontrada en productos alimenticios e industriales. La variedad Coker 312 corresponde a una variedad de algodón vieja que aun se cultiva en superficies reducidas. Bayer CropScience y sus compañías de semillas utilizan las variedades Coker 312 y 315 debido a su respuesta positiva al sistema de cultivo de tejidos usado en el proceso de producción de plantas transgénicas y luego cruzan por métodos convencionales las variedades con aquellas variedades en el mercado hoy. Las variedades Coker 312 y 315, aunque no se cultivan en forma extensiva, son cultivares aceptados comercialmente.

(ILSI database on cotton composition : <http://www.cropcomposition.org/>)

En plantas y microorganismos, la enzima EPSPS esta involucrada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, vitaminas, y varios metabolitos secundarios. Esta enzima no se encuentra presente en animales. El glifosato interfiere con el metabolismo vegetal normal a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvyl-3-phosphoshikimic acid synthase (EPSPS).

La función del ADN introducido es conferirle a la planta tolerancia al herbicida glifosato. El glifosato actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Esta enzima está involucrada en la ruta del ácido shikimico para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y microorganismos.

La tolerancia al herbicida se logró por la integración de la región codificante del gen modificado de maíz (*Zea mays* L.) 2mepsps, codificante para una proteína doble mutante EPSPS (2mEPSPS). La substitución de dos aminoácidos da como resultado una proteína con una alta tolerancia a glifosato pero que mantiene una actividad específica lo suficientemente alta.

### **Uso seguro del organismo donante**

La enzima transgenica procede de *Zea mays* que es un cultivo alimenticio con una larga historia de uso seguro. El maíz es uno de los pocos cultivos indígenas principales del Hemisferio Occidental y se cultiva en casi todas las áreas del mundo sobre una amplia gama de condiciones climáticas (Hallauer *et al.* 1988). Literalmente, miles de productos alimenticios humanos y animales y productos industriales dependen de ingredientes en base a maíz. A lo largo de los años, el maíz ha demostrado un excelente record de uso seguro.

El maíz es consumido como grano de maíz entero o procesado. El maíz es una excelente materia prima para la fabricación de almidón (Anderson y Watson 1982), el cual es convertido en un número de productos de primera y segunda generación. Adicionalmente, el aceite de germen de maíz que es procesado comercialmente representa un porcentaje significativo de la producción de aceite vegetal (Orthoefer and Sinram 1987).

Además del grano de maíz utilizado para el consumo humano, el uso del maíz está ampliamente impulsado por la demanda para alimento animal como ensilaje de maíz entero. El maíz es fácilmente consumido por el ganado. La mayoría de la producción anual en los Estados Unidos de América es para alimentar ganado, pollos y cerdos (Hodge 1982, Watson 1988, Perry 1988).

El maíz (*Zea mays* L.) tiene una larga historia de uso seguro. No es patogénico o tóxico para mamíferos. Expertos en alergia, consideran al maíz como un alergenico alimenticio muy raro; por lo que como la fuente de origen del gen puede ser considerado seguro.

Más importante todavía, la proteína 2mEPSPS es una proteína de 47 kDa que no pertenece a las familias de toxinas identificadas de maíz (ácido fítico o inhibidores de proteinasa). Más aún, no presenta homología con otras familias de otras fuentes que se sabe son tóxicas o alergénicas. Por lo tanto, la probabilidad que la proteína 2mEPSPS induzca una respuesta tóxica o alergénica es insignificante.

### **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.**

Bayer CropScience ha desarrollado una nueva versión de algodón tolerante a glifosato. Esta generación de algodón denominada algodón Glytol Cotton BCS fue producida mediante la inserción estable de la secuencia del transgen en el genoma del algodón convencional, usando un sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. El gen 2mepsps codifica la enzima EPSPS del maíz, tolerante a glifosato. La expresión de la enzima 2m EPSPS en algodón le confiere tolerancia al glifosato, ingrediente activo de la familia de herbicidas agrícolas Roundup. El uso de variedades de algodón Glytol Cotton BCS permitirá al agricultor la aplicación del herbicida glifosato sobre el cultivo, para obtener un excelente control de un amplio espectro de maleza con mínimos riesgos para el cultivo.

## Elementos genéticos de la construcción

| <b>Elemento</b>    | <b>Donante</b>                              | <b>Función</b>                                                                                                                             |
|--------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LB</b>          | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>            | Borde izquierdo del ADN-T de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                                                                              |
| <b>Ph4a748At</b>   | <i>Arabidopsis thaliana</i>                 | Secuencia promotora. Incluye la región del gen de histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .                                              |
| <b>Intron1h3At</b> | <i>Arabidopsis thaliana</i>                 | Secuencia que contiene el primer intrón del gen II de la variante H3.III de histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> .                       |
| <b>TPotp C</b>     | <i>Zea mays</i><br><i>Helianthus annuus</i> | Péptido de transito optimizado.                                                                                                            |
| <b>2mepsps</b>     | <i>Zea mays</i>                             | Tolerancia a herbicida. Secuencia codificante del gen con mutación doble de 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa de <i>Zea mays</i> . |
| <b>3'histonAt</b>  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                 | Secuencia terminadora. Incluye la región 3' no traducida del gen de la histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .                         |
| <b>RB</b>          | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>            | Repetición del borde derecho del ADN-T de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .                                                               |

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

Las líneas de algodón Glytol Cotton BCS fueron obtenidas utilizando el método de transformación mediado por *Agrobacterium*. El plásmido vector pTEM2 que transporta el T-DNA fue generado mediante técnicas de clonación en *E. coli*, transferido a *Agrobacterium tumefaciens* y utilizado para la transformación del algodón para producir la nueva generación de algodón tolerante a herbicida glifosato.

La porción de T-DNA del vector (figura anterior) fue incorporada en el genoma del algodón utilizando el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* y usando cultivo de tejidos de la variedad de algodón Coker 312. Las plantas de algodón obtenidas mediante cultivo de tejidos fueron seleccionadas para tolerancia a glifosato. Las plantas tolerantes fueron también probadas y seleccionadas bajo condiciones de campo en los Estados Unidos. Las líneas Glytol Cotton BCS son los eventos transgénicos seleccionados para las actividades de campo propuestas en esta solicitud.

### Métodos de detección

La característica puede ser detectada tanto a nivel genético molecular o a nivel de bioquímica de proteínas.

La detección genética molecular puede realizarse con un método basado en PCR para confirmar la presencia del material introducido en el material vegetal de *Gossypium hirsutum* L. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para amplificar una pequeña cantidad del ADN de interés de manera de hacerlo detectable. La mayoría de las reacciones de PCR pueden llevarse a cabo como reacciones múltiples, lo cual significa que involucran más de una reacción PCR y por lo tanto más de un blanco. Un par está focalizado en la secuencia de ADN endógeno de la planta; el otro par se focaliza en la secuencia de ADN específica del transgén insertado. La reacción endógena actúa como un control para determinar si el ADN de la planta está presente y si las condiciones de reacción son suficientes para permitir la amplificación. La reacción con el transgén solo amplificará el producto del ADN insertado, haciendo posible distinguir entre muestras transgénicas y no transgénicas. La empresa cuenta con técnicas de PCR para determinar la presencia del material genético insertado en estos eventos.

Las técnicas de detección para el nivel de proteína están basadas en inmunoensayos. Estos ensayos son el Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) basado en la interacción específica entre el anticuerpo y el antígeno. Los pocillos de la fase sólida se recubren con anticuerpos policlonales purificados por afinidad (anticuerpos de captura) que reconocen específicamente la

proteína de interés del gen insertado. La proteína del gen introducido presente en las muestras se une al anticuerpo de captura. La proteína inmovilizada puede ser detectada entonces por la incubación secuencial con anticuerpos mono y policlonales (anticuerpo de detección o segundo anticuerpo) que reconocen la proteína a ser evaluada y un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rabanito (anticuerpo conjugado) contra el segundo anticuerpo. Se agrega luego el sustrato de la peroxidasa, tetrametilbenzidina, el cual es convertido por la peroxidasa en un producto azul en proporción con la cantidad de proteína evaluada presente en la muestra. Luego de la adición de una solución de stop, el producto azul se torna amarillo. La densidad óptica del producto amarillo a 450 nm refleja proporcionalmente la cantidad de proteína presente en la muestra.

Otro método de detección de proteínas son las tiras de flujo lateral. Este método permite la detección cualitativa de la proteína introducida y puede ser realizado bajo condiciones de campo y/o laboratorio.

Para la detección en campo, se puede utilizar la característica de resistencia al herbicida incorporada como marcador 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 glifosato. Se espera que el comportamiento sea el de una planta de algodón normal (morfología, fenología, productividad, etc.).

No se han observado efectos secundarios o no intencionados en los ensayos con variedades de Algodón Glytol cotton BCS bajo condiciones de invernadero o campo en los Estados Unidos.

Observaciones de comportamiento agronómico, rendimiento y morfología ha sido observado en el campo desde la temporada 2001 en EEUU. La apariencia y comportamiento es el esperado por plantas de algodón no transformadas.

El algodón GlyTol Evento GHB614 fue evaluado y comparado con su contraparte convencional, la variedad Coker 312, en las áreas productoras del sur de los Estados Unidos de América. El comportamiento agronómico se estudio en ensayos de campo conducidos bajo las prácticas comunes de cultivo, incluyéndose en el manejo de maleza la aplicación de los herbicidas usados regionalmente tanto en pre-emergencia como en post-emergencia. Adicionalmente, el manejo de maleza con aplicación de glifosato fue evaluado en el algodón GlyTol Evento GHB614. Por lo tanto, se comparó agronómicamente al algodón GlyTol Evento GHB614 en un sistema de manejo de maleza convencional con respecto al manejo de maleza con glifosato.

También fueron evaluadas las características de la semilla en busca de ventajas adaptativas como resultado de la modificación genética.

Las conclusiones de dicho estudio se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a. No se observaron diferencias significativas consistentes cuando se comparó la línea de algodón Evento GHB614 con su contraparte convencional, la variedad Coker 312, después de cultivarse bajo las prácticas de cultivo convencional.
- b. El cultivo manifestó tolerancia a glifosato; no se observó daño a la planta o efectos adversos en los parámetros de crecimiento del algodón después de las aplicaciones de glifosato.
- c. El desempeño general del algodón GlyTol Evento GHB614 fue agronómicamente igual o mejor que el de su contraparte convencional, la variedad Coker 312.
- d. No existieron diferencias significativas en el porcentaje de germinación tanto del algodón GlyTol Evento GHB614 como de la contraparte convencional, el algodón Coker 312 y además no se encontró evidencia de la presencia de dormancia en la semilla.

- e. Analizando la información de las diferentes localidades se observó que el algodón GlyTol Evento GHB614 presentó una maduración y rendimiento similares a la variedad parental no transformada Coker 312 y con relación a las variedades comerciales evaluadas.
- f. No se identificaron, después de la evaluación del comportamiento agronómico del algodón GlyTol Evento GHB614, preocupaciones con respecto a la seguridad del medio ambiente.

#### **Potencial toxicológico o alergénico del material**

El único producto nuevo expresado a partir de la secuencia insertada es la proteína doble mutante EPSPS (2m 5-Enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa).

Para poder evaluar cualquier potencial efecto adverso para los humanos o animales resultantes de la liberación del cultivo conteniendo la proteína 2mEPSPS al ambiente, Bayer CropScience realizó una detallada evaluación de inocuidad en base a la Comisión del *Codex Alimentarius* (Codex; Alinorm 03/34). Como una base, BCS realizó una serie de estudios de inocuidad con la proteína 2mEPSPS, incluyendo búsquedas de homología de secuencias de aminoácidos en comparación con todos los alérgenos y toxinas conocidos presentes en bases de datos públicas, un estudio de digestibilidad *in vitro* de la proteína y un estudio de toxicidad aguda en ratón. Más aún, documentos públicos emitidos por autoridades regulatorias, los cuales indican que miembros de la familia de proteínas EPSPS similares son inocuos, han sido utilizados para sustentar este análisis. Los resultados de los estudios realizados por BCS son consistentes con la información publicada, confirmando que los cultivos conteniendo esta proteína pueden ser utilizados de manera segura como alimento humano o animal.

Se realizó un estudio global de homología de secuencia de aminoácidos comparando la secuencia completa de aminoácidos de la proteína 2mEPSPS 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 2mEPSPS y alguna toxina o alérgeno conocidos.

#### **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. Se incluirá tanto personal de Bayer como de la empresa colaboradora Semillas Olson, S. A.

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

El material ha sido liberado al ambiente en EEUU para ensayos de campo desde el año 2001.

En relación a las autorizaciones concedidas a Bayer CropScience en los Estados Unidos para la realización de pruebas de campo con el evento Glytol Cotton BCS por parte del USDA, se puede acceder directamente a través del sitio en internet <http://www.nbiap.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm> (en la página incluir la lista de "organism" y cuando ésta se despliega seleccionar "cotton"). Se adjunta una tabla de los resultados.

| <b>País</b> | <b>Tipo de autorización</b> | <b>Fecha</b> | <b>Código / N° de autorización</b> | <b>Entidad que otorgó la autorización</b> |
|-------------|-----------------------------|--------------|------------------------------------|-------------------------------------------|
|-------------|-----------------------------|--------------|------------------------------------|-------------------------------------------|

|     |              |           |                                                                                                                        |             |
|-----|--------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| USA | Notification | 2001-2006 | 01-282-03n; 02-072-04n; 02-296-01n; 03-064-14n; 03-255-03n; 04-061-10n; 04-247-01n, 05-060-03n; 05-091-07n; 05-217-05n | APHIS, USDA |
|-----|--------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|

## BIBLIOGRAFIA

Anderson, R.A., Watson, S.A. 1982. The corn milling industry.. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture. I.A. Wolff, Ed. Volume II, Part 1, Plant products. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL USA. Pages 31-78.

ANZFA. 2001. Application A362. Food derived from glyphosate-tolerant corn line GA21. Final risk analysis report. 23 October 2001

Astwood J.D., Fuchs R.L. 1996. Food allergens are stable to digestion in a simple model of the human gastrointestinal tract. Journal of Allergy and Clinical Immunology 97:241.

Chaboute M., Chaubet N., Philipps G., Ehling M., Gigot C. 1987. Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology. 8: 179-191.

Chaubet N., Clement B., Gigot C. 1992. Genes encoding a histone H3.3-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. J.Mol.Biol, 225, 569-574.

Doolittle R.F. 1990. Searching through Sequence Databases. In Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences . Doolittle, R. F. (ed.). Pp. 999-110. Academic Press, San Diego, CA.

FDA. 1992. Statement of policy: foods derived from new plant varieties. Federal Register 57:22984-23005.

Fuchs R.L., Astwood J.D. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. Food Technology 50: 83-88.

Hallauer, A.R., Russell, W.A., Lamkey, K.R. 1988. Corn breeding In Sprague, G.F. and Dudley, J.W. Editors. Corn and corn improvement, Third Edition. Number 18 in the series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA. Pages 463-564.

- Hodge, J.E. 1982. Food and feed uses of corn. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture. I.A. Wolff, Ed. Volume II, Part 1, Plant products. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL USA. Pages 79-87.
- Kimber I., N.I. Kerkvliet N.I., Taylor S.L., Astwood J.D., Sarlo K., Dearman R.J. 1999. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. *Toxicological Sciences*, 48:157-162.
- Lebrun M., Leroux B., Sailland A. 1996. Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996). RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR).
- Lebrun M, Sailland A, Freyssinet G. 1997. Mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene encoding for said protein and transformed plants containing said gene. International patent publication W0 97/04103-A2. 06.02.97. 25 pages.
- Lebrun M., Sailland A., Freyssinet G., Degryse E. 2003. Mutated 5- enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. US patent US6566587B1 ( 20-MAY-2003). BAYER CROPSOURCE SA (FR).
- McGregor S.E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants, Agricultural Handbook No. 496, Unites States Department of Agriculture Research Service, Washington, DC.
- Metcalfe D.D., Astwood J.D., Townsend R., Sampson H.A., Taylor S.L., Fuchs R.L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(S):S165-S186.
- 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.
- OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 10. Paris 1999.
- Orthoefer, F.T., Sinram, R.D. 1987. Corn oil: composition, processing, and utilization. In *Corn Chemistry and Technology*. Watson, S.A. and R.E. Ramstad, Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc., St Paul, Minnesota. Pages 535-551.
- Perry, T.W. 1988. Corn as livestock feed. In: Sprague, G.F., and Dudley, J.W. Editors. *Corn and corn improvement*, Third Edition. Number 18 in the series *Agronomy*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA. Pages 941-963.
- Poehlman, Milton; Sleper, J. 1995. *Breeding field crops*. Fourth Edition. Iowa State University Press/ Ames. USA.).
- Sjoblad, R. D., McClintock J.T., Engler R. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regulatory Toxicol. And Pharmacol.* 15:3-9.
- Steinrücken H.C., Amrhein N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 94(4): 1207-1212.
- Taylor S.L., R.F. Lemanske R.F. Jr., Bush R.K., Busse W.W. 1987. Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann.Allergy* 59:92-99.
- Taylor S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technology* 46: 146-152.

- 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.
- Watson, S.A. Corn marketing, processing and utilization. 1988. In: Sprague, G.F., and Dudley, J.W. Editors. Corn and corn improvement, Third Edition. Number 18 in the series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA. Pages 881-940.
- Zambryski P. 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Ann. Rev. Genet.* 22: 1-30.