

**Información solicitada para la publicación de las Decisiones y Evaluaciones del Riesgo de autorizaciones brindadas en el marco de la Legislación Nacional vigente en el CIISB-BCH Costa Rica**

**EVENTO ALGÓDON ENLIST DAS-8191Ø-7**

**A. Información sobre el OVM**

---

- a. Familia: **Malvaceae**
- b. Género: **Gossypium**
- c. Especie / Subespecie: *hirsutum* L.
- d. Variedad o línea mejorada:
- e. Nombre común: **Algodón**
- f. Nombre comercial: **Algodón Enlist**
- g. Identificador único del OVM: **DAS-8191Ø-7**

**Tabla 1. Información taxonómica del algodón**

Clasificación Científica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Subfamilia	Malvoideae
Tribu	Gossypieae
Género	Gossypium
Especie	<i>hirsutum</i> L.
Nombre binomial	
<b><i>Gossypium hirsutum</i></b>	



## B. Características de la Modificación

### a. Características del Vector (Anexo III 9 (c)): Características del vector, incluida su identidad, si la tuviera, su fuente de origen y el área de distribución de sus huéspedes;

El algodón (*Gossypium hirsutum* L.) evento DAS-8191Ø-7 fue desarrollado por transformación mediada por *Agrobacterium* del plásmido o vector pDAB4468

El vector pDAB4468 pesa aproximadamente 12-kb y contiene un inserto de ADN-T que está definido por las fronteras A y B del ADN-T. El ADN-T contiene los casetes de expresión de los genes ***aad-12*** y ***pat*** junto con la secuencia RB7-MAR. El casete de expresión del gen está compuesto de secuencias que serán transcritas (la secuencia codificante del gen) y los elementos reguladores necesarios para la expresión de esas secuencias (por ejemplo, promotor, terminador). Los elementos genéticos presentes en el vector pDAB4468 se encuentran en la **Figura 1 y Error! Reference source not found..**

La expresión del gen *aad-12* está controlada por el promotor AtUbi10 de *Arabidopsis thaliana* el cual es conocido por conducir una expresión constitutiva de los genes que controla (Norris et al., 1993). La secuencia terminadora del gen *aad-12*, AtuORF23 3' UTR es derivada del plásmido pTi15955 de *Agrobacterium tumefaciens* (Barker et al., 1983).

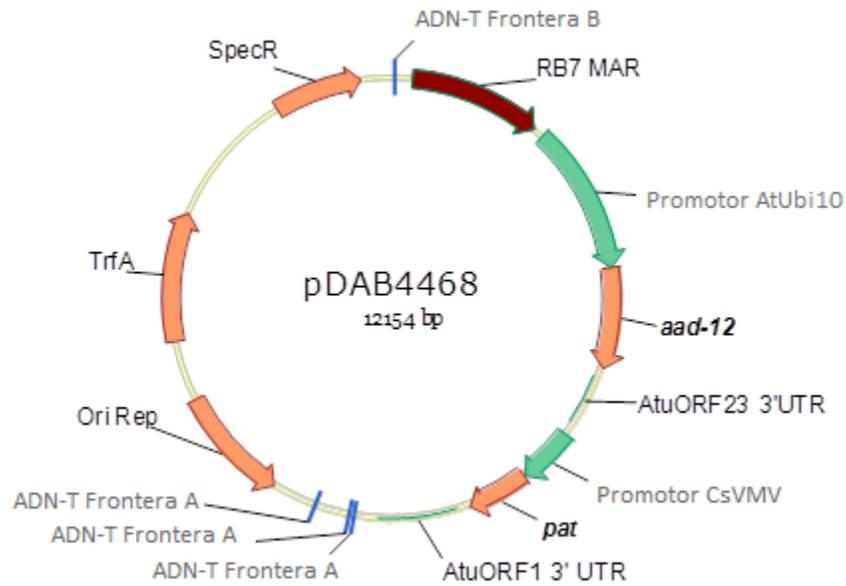
La expresión del gen *pat* está controlada por el promotor del virus del mosaico de la nervadura de la yuca CsVMV y por la secuencia AtuORF1 3' UTR del plásmido pTi15955 de *A. tumefaciens*. El virus del mosaico de la nervadura de la yuca es un virus de ADN de doble cadena que infecta a las plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y que ha sido caracterizado como un pararetrovirus de plantas perteneciente al subgrupo caulimovirus. El promotor CsVMV es conocido por dirigir una expresión constitutiva de los genes que controla (Verdaguer et al., 1996).

**Tabla 2. Elementos Genéticos del ADN-T inserto del plásmido pDAB8264.**

Elemento genético	Inicio del elemento	Fin del elemento	Longitud	Descripción
<b>Region ADN-T</b>				
ADN-T Frontera B	1	24	24	Transferencia de secuencias de ADN
Secuencia interpuesta	25	160	136	Secuencia del plásmido Ti pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
RB7-MAR	161	1326	1166	Región de unión a la matriz (MAR) de <i>Nicotiana tabacum</i> (Hall <i>et al.</i> , 1991)
Secuencia interpuesta	1327	1421	95	Secuencia del plásmido pENTR/D-TOPO (Invitrogen Cat. No. A10465) y múltiples sitios de clonación.
AtUbi10	1422	2743	1322	Gen poliubiquitina UBQ10 de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que comprende el promotor, la region 5'no

				traducida y el intrón (Norris <i>et al.</i> , 1993)
Secuencia interpuesta	2744	2751	8	Secuencia usada para la clonación del ADN
aad-12	2752	3633	882	Versión sintética, optimizada para plantas del gen ariloxialcanoato dioxigenasa de <i>Delftia acidovorans</i> (Wright <i>et al.</i> , 2010a)
Secuencia interpuesta	3634	3735	102	Secuencia usada para la clonación del ADN
AtuORF23	3736	4192	457	Región no traducida 3' (UTR) que comprende el sitio de terminación de la transcripción y poli-adenilación del marco abierto de lectura 23 (ORF23) del plásmido pTi15955 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia interpuesta	4193	4306	114	Secuencia del plásmido pENTR/D-TOPO (Invitrogen Cat. No. A10465) y múltiples sitios de clonación.
CsVMV	4307	4823	517	Promotor junto con la región no traducida 5' derivada del Virus de Mosaico de la Nervadura de la Yuca (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996).
Secuencia interpuesta	4824	4830	7	Secuencia usada para la clonación del ADN
pat	4831	5382	552	Versión sintética, optimizada para planta del gen de la enzima fosfinotricina acetil-transferasa (PAT), aislado <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)
Secuencia interpuesta	5383	5484	102	Secuencia del plásmido pCRI2.1(Invitrogen Cat. No. K205001) y múltiples sitios de clonación.
AtuORF1	5485	6188	704	Región no traducida 3' (UTR) que comprende el sitio de terminación de la transcripción y poli-adenilación del marco abierto de lectura 1 (ORF1) del plásmido pTi15955 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia interpuesta	6189	6416	228	Secuencia del plásmido Ti C58 (Zambryski <i>et al.</i> , 1982; Wood <i>et al.</i> , 2001)
Elemento genético	Inicio del elemento	Fin del elemento	Longitud	Descripción
AND-T Frontera A	6417	6440	24	Transferencia de secuencias de ADN
Secuencia interpuesta	6441	6459	19	Secuencia del plásmido Ti C58 (Zambryski <i>et al.</i> , 1982; Wood <i>et al.</i> , 2001)
AND-T Frontera A	6460	6483	24	Transferencia de secuencias de ADN
Secuencia interpuesta	6484	6770	287	Secuencia del plásmido Ti pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
AND-T Frontera A	6771	6794	24	Transferencia de secuencias de ADN
Región del esqueleto del plásmido				
Secuencias del esqueleto del plásmido	6795	7173	379	Secuencias del esqueleto del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Ori Rep	7174	8193	1020	Secuencias de origen de replicación del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Secuencias del esqueleto del plásmido	8194	8738	545	Secuencias del esqueleto del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Trf A	8739	9887	1149	Secuencias de replicación del plásmido para la

				proteína Trf A a partir del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Secuencias del esqueleto del plásmido	9888	11091	1204	Secuencias del esqueleto del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Spec R	11092	11880	789	Secuencias de gen de resistencia a espectinomicina (Fling <i>et al.</i> , 1985)
Secuencias del esqueleto del plásmido	11881	12154	274	Secuencias del esqueleto del plásmido para clonación



**Figura 1. Mapa del plásmido pDAB4468**

## **b. Inserto o Insertos (Anexo III 9 (d)): Características genéticas del ácido nucleico insertado y de la función que especifica, y/o características de la modificación introducida;**

---

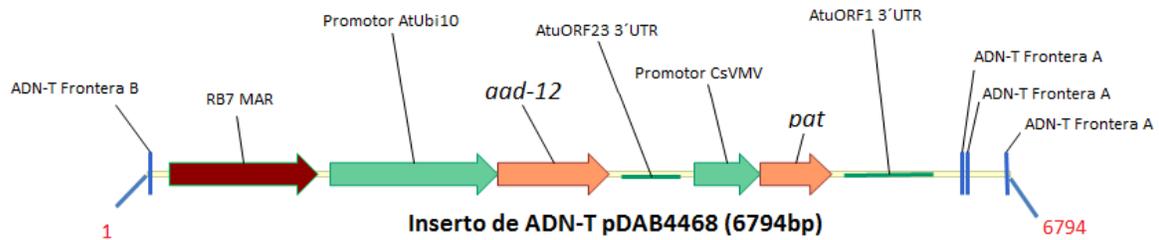
El algodón DAS-8191Ø-7 ha sido modificado genéticamente para expresar la proteína ariloxialcanoato dioxigenasa-12 (AAD-12). La proteína AAD-12 es una enzima con una actividad de dioxigenasa dependiente de la alfa-cetoglutarato, que tiene como resultado la inactivación metabólica de los herbicidas de la familia de los ariloxi-alcanoicos. El gen *aad-12*, que expresa la proteína AAD-12, se obtuvo a partir de *Delftia acidovorans*, una bacteria gram negativa del suelo la cual puede ser usada para transformar el ácido ferúlico en vainillina y metabolitos de sabor relacionados. La proteína PAT proporciona tolerancia al herbicida glufosinato y fue usada como marcador de selección durante el desarrollo del algodón DAS-8191Ø-7.

El casete de expresión *aad-12* está diseñado para expresar el gen optimizado para planta, que codifica a la proteína ariloxialcanoato dioxigenasa-12 (AAD-12). El gen *aad-12* fue aislado de *Delftia acidovorans* y la versión sintética del gen fue optimizada para su expresión en la planta mediante la modificación del sesgo del codón G+C. Ambas secuencias de ADN del gen *aad-12*, la nativa y la optimizada para plantas, son 80% idénticas. El gen *aad-12* se diseñó para expresar la proteína Ariloxialcanoato dioxigenasa-12 (AAD-12) que consiste en 293 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 32 kDa. La expresión de la proteína AAD-12 en las plantas confiere tolerancia a herbicidas como el 2,4-D por la producción de la enzima ariloxialcanoato dioxigenasa-12 (AAD-12).

El casete de expresión *pat* se diseñó para expresar la fosfinotricina N-acetiltransferasa (proteína PAT). El gen *pat* se deriva de la bacteria común del suelo *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben et al., 1988). La expresión de la proteína PAT en plantas de algodón confiere tolerancia a herbicidas con ingrediente activo glufosinato, sin embargo este gen fue introducido sólo como gen marcador de selección para el desarrollo del evento de algodón DAS-8191Ø-7. El gen *pat* codifica para una proteína PAT de 183 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 20.6 k Da. El gen *pat* se ha utilizado ampliamente como gen de selección en muchos productos desregulados por la USDA. (USDA, 1996, 2001, 2004, 2005).

**Tabla 3. El resumen de los genes insertados en el producto DAS-81910-7**

Evento	Gen insertado	Organismo donador del gen	Proteína codificada	Función
DAS-81910-7	<i>aad-12</i>	<i>Delftia acidovorans</i> , una bacteria gram negativa del suelo	Expresar la proteína ariloxialcanoato dioxigenasa-12 (AAD-12).	La proteína AAD-12 es una enzima con una actividad de dioxigenasa dependiente de la alfa-cetoglutarato, que tiene como resultado la inactivación metabólica de los herbicidas de la familia de los ariloxi-alcanoicos (2,4-D)
	<i>pat</i>	Forma sintética del gen derivado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Enzima fosfotricina N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfotricina) por acetilación



**Figura 2. Inserto de ADN-T pDAB4468 (6794bp)**

## **c. Detección e identificación del OVM (Anexo III 9 (f)): Métodos sugeridos de detección e identificación y su especificidad, sensibilidad y fiabilidad**

---

### **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ALGODÓN DAS-8191Ø-7**

#### **Preparación de la Sonda de ADN**

Las sondas de ADN se generaron a través de PCR basada en la incorporación de un nucleótido de digoxigenina (DIG) marcado, [DIG]-dUTP, en fragmentos generados por los primers específicos para los elementos genéticos y las regiones del esqueleto del plásmido pDAB4468. La generación de las sondas de ADN a través de síntesis de PCR se llevó a cabo usando un kit para Síntesis de Sondas por PCR DIG (Roche Diagnostics). Las sondas marcadas se purificaron de los geles de agarosa y se cuantificaron con un reactivo PicoGreen (Invitrogen).

#### **Recolección de Muestras y Extracción de ADN**

Las muestras de hoja fueron recolectadas del invernadero para la extracción de ADN genómico. El ADN genómico fue extraído siguiendo el método de CTAB modificado. Brevemente, las muestras de hoja fueron molidas de forma individual en nitrógeno líquido, seguido de la adición del búfer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP-10, 2%  $\beta$ -ME) a una proporción de ~5:1 además de >10 $\mu$ L de RNasa-A y proteinasa K (Qiagen). Después de aproximadamente 2 horas de incubación a ~65°C con una suave agitación, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se extrajeron con un volumen igual de cloroformo:octanol = 24:1 tres veces. El ADN se precipitó mediante la mezcla del sobrenadante con aproximadamente 0.7 del volumen de isopropanol. El ADN precipitado fue enjuagado con etanol al 70%, se secó con aire y después se disolvió en un volumen apropiado de 1 $\times$  TE búfer (pH 8.0). El ADN genómico resultante se purificó adicionalmente con un Genomic-tip 500/G siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). El ADN se cuantificó con un reactivo PicoGreen (Invitrogen), y se visualizó en un gel de agarosa para verificar la calidad del ADN genómico.

#### **Digestión de ADN y la Separación Electroforética de los Fragmentos de ADN**

El ADN genómico extraído del tejido de la hoja del algodón fue digerido con enzimas de restricción al combinar aproximadamente 10  $\mu$ g de ADN genómico con aproximadamente 5-10 unidades de la enzima de restricción seleccionada por  $\mu$ g de ADN en el búfer de reacción correspondiente. Cada muestra se incubó a 37 °C durante la noche. Las muestras de ADN digerido fueron precipitadas con Quick-Precip (Edge BioSystems) y re-suspendidas para lograr el volumen deseado para la carga del gel. Las muestras de ADN y los marcadores de peso molecular fueron sometidos a electroforesis a través de geles de agarosa (0.8%) con

1×TBE búfer a 35-65 V por 18-22 horas, para lograr la separación del fragmento. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y el ADN se visualizó bajo luz UV. Se hizo un registro fotográfico de cada gel teñido.

## **Transferencia Southern**

Los fragmentos de ADN de las geles de agarosa fueron transferidos a membranas de nylon mediante la transferencia Southern, esencialmente como lo describió Memelink et al. (1994). Los geles de agarosa fueron depurados, desnaturalizados, neutralizados *in situ* y transferidos a la membrana de nylon en un búfer 10× SSC (3 M NaCl, 0.3 M Citrato de Na) utilizando un sistema de transporte de humedad. Después de la transferencia a la membrana, el ADN fue unido a la membrana mediante el entrecruzamiento a través del tratamiento con UV.

## **Hibridación**

Las sondas marcadas fueron hibridadas con el ADN objetivo en las membranas de nylon utilizando la Solución DIG Easy Hyb de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics). Los marcadores II y VII de peso molecular de ADN marcados con DIG, fueron utilizados para determinar el tamaño de los fragmentos de hibridación en el Southern Blot.

## **Detección**

Las sondas DIG-marcadas, unidas a las membranas de nylon después de un riguroso lavado, fueron incubadas con anticuerpo de anti-Dioxigenina conjugado con AP (Fosfatasa Alcalina; Alkaline Phosphatase) durante ~1 hr a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-DIG unido a las sondas fue visualizado entonces utilizando el Sistema de Detección de Ácido Nucleico CDP-Star Quimioluminiscente (Roche Diagnostics). Los Blots fueron expuestos a una película quimioluminiscente para uno o más puntos para detectar los fragmentos de hibridación, y para visualizar los estándares de peso molecular. Entonces, las imágenes fueron escaneadas y almacenadas. El número y tamaño de cada una de las bandas detectadas fue documentada para cada digestión y para cada sonda.

Una vez que los datos fueron registrados, las membranas se lavaron con agua milli-Q y luego despojadas de la sonda unida en una solución que contenía 0.2 de M NaOH y 1.0% de SDS. El procedimiento de separación con base en alcalinos elimina con éxito las sondas marcadas de las membranas, permitiéndoles ser re-hibridadas con una sonda diferente de ADN.

## **MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA AAD-12**

### **Purificación de la proteína AAD-12 del tejido vegetal de algodón DAS-8191Ø-7 para análisis estructurales**

Se preparó una resina de inmunoafinidad para AAD-12 mediante la mezcla de 50 µL de una suspensión de Resinas de afinidad de proteína A/G (ThermoScientific) con 200 µg de anticuerpo monoclonal α-AAD-12 y se incubaron durante la noche a 4 °C. La resina se lavó con PBST y, la IgG, unida irreversiblemente, se acopló a la resina mediante incubación en 200 µL de PBST con 1.8 mM DSS por 60 minutos a temperatura ambiente con mezclado. El entrecruzamiento se terminó mediante la incubación por 5 minutos, seguida de la

adición de 500  $\mu$ L de 1.0 M Tris-HCL pH 8.0. La resina se lavó extensamente con PBST y se usó inmediatamente para la inmuno-captura de la proteína AAD-12.

Para generar extractos de hoja de algodón adecuados para el aislamiento de AAD-12, se suspendieron 5-10 gramos de tejido liofilizado de algodón DAS-8191Ø-7 mediante agitación en búfer de extracción frío (50 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA) a una proporción de ~15 mL de búfer por gramo de tejido seco. Un comprimido inhibidor de proteasas (Roche) y PVPP al 10% (w/w) se adicionaron al tejido suspendido. La mezcla fue agitada a 4 °C por 30 minutos para hidratar completamente y extraer las proteínas solubles. Después la mezcla se filtró a través de una sola capa de miracloth pre-humedecida (Calbiochem) y el extracto fue clarificado adicionalmente por centrifugación a 38,000  $\times$  g por 30 minutos. El sobrenadante primario resultante se removió y mezcló con un volumen igual de búfer de extracción complementado con urea 2 M y Tween-20 al 0.2% para una concentración final de 1 M y Tween-20 al 0.1% respectivamente. Para aislar la proteína AAD-12, típicamente se incuban 15 mL de extracto de hoja con 50  $\mu$ L de resina de captura de AAD-12 recién preparada. Las reacciones de unión se incubaron en lote a 4 °C, durante un periodo de 3 horas a toda la noche. La resina se recolectó por centrifugación y luego se lavó sucesivamente dos veces con 1.0 mL de búfer de extracción con urea 1 M + Tween-20 al 0.1% y después se lavó una vez más con 1.0 mL de búfer de extracción con urea 0.5 M + Tween-20 al 0.05% seguido de 1.0 mL de búfer de extracción solo. Finalmente, la resina se lavó con 1.0 mL de HEPES 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM o 1.0 mL de PBST. La resina con la AAD-12 capturada fue almacenada a -80 °C o analizada inmediatamente.

### **Ensayo de actividad de la proteína AAD-12 derivada del tejido vegetal del algodón DAS-8191Ø-7**

Se utilizó un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad de ambas enzimas, la derivada de hojas de algodón y la derivada de microbios. Los ensayos se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 mL a temperatura ambiente con un volumen total por ensayo de 150  $\mu$ L como se describió previamente (Fukumori and Hausinger, 1993). Los ensayos típicos contenían HEPES 100 mM pH 7.0, Fe(II)(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 1 mM, ascorbato de sodio 1mM, S-Dicloroprop (en DMSO), y 0.05  $\mu$ M de AAD-12. Todas las reacciones se iniciaron mediante la adición de  $\alpha$ -ketoglutarato a una concentración final de 2 mM.

### **Resultados del ensayo de actividad de la proteína AAD-12 derivada de tejido vegetal del algodón DAS-8191Ø-7**

Para evaluar la actividad enzimática de AAD-12, se llevaron a cabo ensayos de cinética con ambas proteínas AAD-12, la derivada de algodón DAS-8191Ø-7 y la derivada de microbios. Los ensayos se llevaron a cabo por 6 minutos a 28 °C con 0.05  $\mu$ M de enzima. La proteína AAD-12 aislada de *P. fluorescens* y del algodón DAS-8191Ø-7 mostraron los perfiles de actividad hiperbólica esperada cuando se evaluaron en un rango de concentraciones de sustrato S-dicloroprop. El modelo Michaelis-Menten reveló valores Km aparentes de 41.2  $\pm$  4.8  $\mu$ M y 29.8  $\pm$  1.0  $\mu$ M para las proteínas derivadas de microbios y del algodón respectivamente. Para estos ensayos, los valores Vmax aparentes para la proteína AAD-12 derivada de microbios y del algodón fueron también similares con 6.8  $\pm$  0.3 y 5.0  $\pm$  0.1  $\mu$ M/min respectivamente. El acuerdo relativo en los parámetros cinéticos medidos para ambas proteínas, derivada de microbios y derivada del algodón, indica que las enzimas son funcionalmente equivalentes.

## **MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA PAT**

### **Purificación de la proteína PAT del tejido vegetal de algodón DAS-8191Ø-7 para análisis estructurales**

La proteína PAT se extrajo del tejido de algodón molido usando HEPES 50 mM (pH 7.8), NaCl 300 mM, EDTA 10 mM (Búfer de extracción), mediante pesaje y transferencia del tejido de las hojas molido en un vaso de vidrio helado y añadiendo búfer de extracción a razón de 20 mL por 1 gramo de tejido. El tejido se mezcló brevemente y se añadió PVPP (insoluble) a la mezcla a una razón del 10% (w/w). La mezcla se agitó por 20 minutos y la solución se filtró a través de una capa de miracloth (Calbiochem) pre-humedecida, y se aclaró por centrifugación a  $\sim 30,000 \times g$ , 4 °C por 30 minutos. El sobrenadante primario resultante se removió y mezcló con un volumen igual de búfer de extracción complementado con urea 2M y Tween-20 al 0.2% para una concentración final de 1 M y Tween-20 al 0.1% respectivamente.

La proteína PAT se purificó del sobrenadante por inmuno-precipitación usando anticuerpos policlonales entrecruzados a la Resina de Agarosa con Proteína A/G (ThermoScientific) a una razón de 4 mg de anticuerpo por mililitro de resina. Por cada 15 mL de sobrenadante aclarado, se añadieron 50  $\mu$ L (200  $\mu$ L de anticuerpo) de resina acoplada y se dejó incubar en un mezclador rotativo por 3 horas a 4 °C. La resina se recuperó por centrifugación a  $\sim 3,500 \times g$  por 5 minutos a 4 °C y se transfirió a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL usando 1 mL de búfer de lavado. Después la resina se lavó secuencialmente para un total de 5 lavados usando diferentes amortiguadores (vide infra). Cada lavado se realizó añadiendo búfer al tubo que contenía la resina, rotando el tubo en un mezclador por  $\sim 5$  min a 4 °C, centrifugando la muestra a  $\sim 500 \times g$  por 1 min, y descartando el sobrenadante. Primero la resina se lavó dos veces con 0.9 mL de búfer de extracción complementado con urea 1 M y Tween-20 al 0.1%, luego otra vez 0.9 mL de búfer de extracción complementado con urea 0.5 M + Tween-20 al 0.05%, otra con búfer de extracción solo, y una última vez con HEPES 50 mM (pH 7.8), EDTA 0.1 mM. Después del último lavado, rotado y decantado, la resina se centrifugó por un minuto a  $500 \times g$  a 4 °C para sedimentar la resina y el sobrenadante se descartó. Finalmente la resina se centrifugó por 10 segundos a  $20,000 \times g$  a 4 °C para sedimentar la resina y el sobrenadante se descartó nuevamente. La proteína inmuno-purificada se almacenó unida a la resina a -20 °C hasta ser usada para el SDS-PAGE seguido del análisis de espectrometría de masas y para el SDS-PAGE seguido del análisis de glicosilación.

### **Espectrometría de masas – huella peptídica y análisis de secuencia de la proteína PAT derivada del algodón evento DAS-8191Ø-7 y de la derivada de microbios**

La proteína PAT derivada de la planta y purificada por inmunoafinidad se sometió a digestión en gel con tripsina y Asp-N, seguida por la desorción/ionización asistida por matriz espectrometría de masa de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) y MALDI-TOF MS-MS. Para cada digestión con enzimas, las bandas resueltas en el gel SDS-PAGE a  $\sim 20$  kDa correspondientes a la proteína PAT (se usaron dos bandas por digestión conteniendo aproximadamente 100 ng por carril, resultando en 200 ng de proteína total por reacción de digestión) se cortaron con un bisturí estéril y se procesaron como se menciona a continuación (una mitad de la sección de la proteína estándar del gel se procesó junto con la muestra de la proteína, en un tubo separado, usando un procedimiento idéntico). Los trozos de gel se trituraron con un micro-mano de mortero estéril en un tubo de microcentrifuga con silicona, y se destiñeron de la siguiente manera: se añadieron 0.4 mL de ACN al 50% y 0.4 mL de búfer de bicarbonato de amonio, el tubo fue sellado y agitado a temperatura ambiente por 30 minutos en un Thermomixer R a 1100 rpm; el tubo se centrifugó para asentar los trozos de gel, y el sobrenadante se removió con una punta de pipeta y se descartó; el procedimiento de destiñido se repitió 2 veces.

Las proteínas se redujeron y alquilaron en gel de la siguiente manera: (1) 0.2 mL de solución DTT se adicionó a los trozos de gel, y el tubo se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en un Thermomixer R; (2) el tubo se centrifugó, y la solución DTT se removió mediante una punta de pipeta; (3) los trozos de gel se lavaron con 0.5 mL de búfer de bicarbonato de amonio 25 mM, el tubo se centrifugó y el búfer se removió. Después de los procedimientos de desteñido/reducción, los trozos de gel se encogieron en acetonitrilo puro y después se secaron en un evaporador centrífugo por 30 minutos.

Los trozos de gel secos se rehidrataron con una solución de tripsina (25 µg en 500 µL de búfer de bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7.8; recién preparado), o solución Asp-N (2 µg en 50 µL de búfer de fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0; recién preparado) e incubaron en una incubadora a 37 °C por aproximadamente 16 horas (toda la noche). Después de eso, los péptidos se extrajeron de las porciones de gel secuencialmente con 0.4 mL de ACN al 50%/TFA al 0.1%, después 0.4 mL de ACN al 50/ FA al 5%, y finalmente 0.4 mL de ACN al 75%/FA al 5% (30 min por extracción en un Thermomixer R a temperatura ambiente, moviendo a 1100 rpm). Los extractos de cada muestra se combinaron y secaron en un evaporador centrífugo.

Los péptidos secos fueron reconstituídos en 30 µL de TFA al 0.1% en agua y se purificaron por análisis MALDI MS usando C18 Zip-Tips (Millipore), de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Los péptidos purificados fueron eluidos directa y secuencialmente sobre la placa MALDI, con solución acuosa de ACN al 10%, 25%, 50% y 75% (amortiguada con 0.1% de TFA). Las fracciones C18 ZipTip se mezclaron con 4 µL de la matriz CHCA (10 mg/mL de CHCA en ACN al 50% complementado con TFA al 0.1%), y 1 µL de la mezcla de la muestra-matriz se depositaron sobre el objetivo MALDI y se dejaron secar al aire. Las preparaciones de muestra se analizaron directamente por espectrometría de masas MALDI-TOF. Todos los espectros de masa se adquirieron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF AB Sciex 4800. La calibración de masa se realizó con un Kit de patrones de masa para calibración de los instrumentos AB SCIEX TOF/TOF. Los fragmentos peptídicos de la proteína PAT derivada del algodón (incluidos los extremos N- y C- terminales) se analizaron y compararon con la secuencia de la proteína derivada de microbios.

## **Purificación de la proteína PAT del tejido vegetal del algodón DAS-8191Ø-7 para análisis funcionales**

La proteína PAT se extrajo mediante la mezcla de tejido de hoja molido (15g) con 350 mL de Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, EDTA 1mM, TCEP 1 mM, complementado con PVPP al 1% (polivinilpirrolidona, insoluble) y un coctel inhibidor de proteasas, usando una mezcladora de barra (~1 g de tejido por 20 mL de búfer). El material mezclado se coló a través de 2 capas de Miracloth pre-humedecido (Calbiochem), y se aclaró por centrifugación a ~35,000 × g, 4 °C por 45 minutos para remover todas las partículas de PVPP.

El sobrenadante se transfirió a un vaso pre-enfriado y la solución se agitó a 4 °C. Se añadió sulfato de amonio lentamente al extracto durante un periodo de tiempo de 1 hr hasta que se consiguió una saturación de 40% del sulfato de amonio. La solución se agitó por dos horas adicionales después de la adición final de la sal. La solución se centrifugó a 35,000 × g, 4 °C por 60 minutos para remover las proteínas precipitadas.

El sobrenadante, que contenía a PAT, se recolectó y regresó al vaso helado a 4 °C con agitación. El sulfato de amonio se añadió al extracto durante una hora o hasta que se consiguió el 70% de saturación. La solución se dejó equilibrar durante toda la noche. El material precipitado de la proteína se sedimentó mediante la centrifugación de la mezcla a 35,000 × g, 4 °C por 60 minutos y el sobrenadante se descartó. El sedimento que contenía PAT se re-suspendió en 45 mL de búfer HIC A frío (Búfer HIC A = Tris 50 mM (pH 7.5), glicerol al 5% con sulfato de amonio 1.25 M; Búfer HIC B = Tris 50 mM (pH 7.5), glicerol al 5%). La re-suspensión se centrifugó a ~35,000 × g, 4 °C por 60 minutos para remover cualquier partícula no disuelta antes de la cromatografía.

El sobrenadante clarificado se cargó en una columna Phenyl HP HiTrap de 10 mL (dos columnas de 5 mL conectadas en serie, GE Healthcare) equilibrada con Búfer A HIC. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna (CV) del búfer HIC A, seguido por 5 CV de búfer HIC B al 5%. Las proteínas unidas fueron eluidas con 50 CV de gradiente de elución lineal a búfer B IIC al 100%. Las fracciones (3.5 mL volumen) se recolectaron comenzando a partir de que se tenía una concentración de búfer HIC B del 10% y las fracciones impares se evaluaron para el contenido de PAT a través de tiras de flujo lateral (Enviroligix, Inc) y por el ensayo de actividad de PAT.

Las fracciones que contenían la proteína PAT se reunieron y concentraron usando un dispositivo de filtro MWCO de 10 kDa (Amicon) de 122.5 mL a 4.2 mL. El contenido de sal de la muestra concentrada se ajustó para coincidir con las condiciones iniciales de la cromatografía (Búfer A HCl al 100%) y se cargó en una columna Phenyl HP HiScreen de 9.4 mL (dos columnas de 4.7 mL conectadas en serie, GE Healthcare) equilibrada con Búfer HIC A. La columna se lavó con 6 volúmenes de columna del búfer HIC A, y las proteínas unidas fueron eluidas con 20 CV de gradiente de elución lineal a Búfer HIC B al 100%. Las fracciones (2.0 mL volumen) se recolectaron desde que las condiciones eran de 0% de concentración del búfer HIC B, y las fracciones impares se evaluaron para el contenido de PAT a través de tiras de flujo lateral (Enviroligix, Inc) y por el ensayo de actividad de PAT.

Las fracciones que contenían la proteína PAT se reunieron y concentraron usando un dispositivo de filtro MWCO de 10 kDa (Amicon) de 46 mL a 3.0 mL. La muestra concentrada se aplicó a una columna de HiLoad 16/600 Superdex 200 de 120 mL (GE Healthcare) equilibrada con Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM y glicerol al 5%. Fracciones de un mililitro se recolectaron y analizaron para el contenido de PAT mediante tiras de flujo lateral (Enviroligix, Inc) y mediante el ensayo de actividad de PAT. Las fracciones con PAT se reunieron y concentraron usando un dispositivo de filtro MWCO de 10 kDa (Amicon) de 8 mL a 0.8 mL. El producto final de la purificación se preparó en alícuotas, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

## **Resultados del ensayo de actividad y enriquecimiento de la proteína PAT derivada del tejido vegetal del algodón DAS-8191Ø-7**

Las proteínas PAT derivadas de microbios y del algodón DAS-8191Ø-7 se ensayaron usando un ensayo espectrofotométrico establecido con modificaciones menores (De Block et al, 1987; Mahan et al, 2006.). Tanto la proteína PAT derivada del algodón DAS-8191Ø-7 como la derivada de microbios mostraron gráficos cinéticos hiperbólicos cuando se evaluaron en un rango de concentraciones de glufosinato. Las curvas de Michaelis-Menten revelaron que las proteínas PAT derivadas de microbios y del algodón tienen valores de  $V_{max}$  similares de  $9,30 \pm 0,10$  y  $7,19 \pm 0,06$   $\mu\text{M}/\text{min}$ , respectivamente. El valor de  $K_m$  para PAT derivada de microbios ( $150 \pm 3$  M) fue comparable al valor de la enzima derivada de algodón ( $117 \pm 4$  M). Ambas preparaciones de enzimas también muestran valores de  $k_{cat}$  similares de  $6,20$   $\text{s}^{-1}$  para la derivada de microbios y  $4,80$   $\text{s}^{-1}$  para PAT derivada de algodón. Las eficiencias catalíticas calculadas ( $k_{cat} / K_m$ ) fueron casi idénticas para ambas enzimas a  $4,13 \times 10^4$  y  $4,11 \times 10^4$   $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , para la derivada de microbios y para la derivada del algodón DAS-8191Ø-7, respectivamente. Estos resultados demuestran que la PAT derivada del tejido de algodón DAS-8191Ø-7 muestra parámetros cinéticos similares a la PAT purificada a partir de *P. fluorescens* y por lo tanto son funcionalmente equivalentes.

#### **d. Uso previsto (Anexo III 9 (g)): Información acerca del uso previsto del organismo vivo modificado incluido un uso nuevo o distinto comparado con los del organismo receptor o los organismos parentales**

---

El algodón genéticamente modificado DAS-8191Ø-7 tolerante a los herbicidas Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y glufosinato se derivada de *Gossypium hirsutum*. La variedad de algodón Coker 310 (*G. hirsutum*), disponible al público, fue usada como línea receptora para la generación del evento DAS-8191Ø-7. La variedad Coker 310 fue desarrollada por la división de algodón de la Compañía de Semillas con Pedigrí Coker y se trata de una variedad comercial vieja de algodón americano resultante de la cruce de Coker 100 Staple por Deltapine 15 y seleccionada a través de generaciones sucesivas de selección de líneas (Smith et al., 1999; Bowman et al., 2006).

El algodón *Gossypium hirsutum*, pertenece a la familia Malvácea, a la tribu Gossypieae y al género *Gossypium* (Cronquist, A. 1981). El género *Gossypium* comprende 50 especies (Fryxel 1992; Percival, et al., 1999). Usualmente, sólo cuatro especies de este género son cultivadas y se les conoce con el término genérico de algodón.

El algodón es uno de los commodities más importantes en muchos países en desarrollo de África, Asia y América Latina. Debido a sus múltiples posibilidades de encadenamiento, el algodón se constituye en un importante proveedor de empleo estacional e ingreso para los agricultores. Aunado a ello, las exportaciones de algodón son una fuente importante de divisas en numerosos países, además representan una parte importante del Producto Interno Bruto (PIB) y de la recaudación fiscal.

En 2012 los principales productores de fibra fueron China, India, Estados Unidos, Pakistán y Brasil, que en conjunto representaron alrededor del 80% de la producción mundial.

Referente al comercio del algodón, son cuatro los países exportadores dominantes: Estados Unidos, India, Brasil y Australia, contando con dos terceras partes del total de las exportaciones mundiales de la fibra de algodón en el año 2012

Actualmente, el principal flujo comercial del algodón de estos países es hacia Asia. Esta región ha llegado a ser la líder importadora de algodón acorde con su expansión en la industria de hilado y textiles, siendo China por mucho el país importador líder con una participación en las importaciones mundiales de alrededor del 32% en 2012. Diez países (China, Bangladesh, Turquía, Pakistán, Indonesia, Vietnam, Tailandia, India, Corea del Sur y México) importaron en conjunto un poco más del 80% de la fibra en dicho año. (SAGARPA, 2014)

El uso primario del algodón es para fibras, que son principalmente usadas en la manufactura de una gran cantidad de productos textiles. Solamente la semilla de algodón es procesada para elaborar cuatro principales productos para alimentación humana y animal: aceite, harina, cascarilla y fibras. Sólo el aceite y las fibras de la semilla de algodón son usados en aplicaciones de alimento en las cuales las semillas son principalmente usadas para obtener aceite comestible y alimento para ganado.

Sólo la cápsula del algodón es útil tanto para las fibras textiles o para la alimentación humana o animal. El resto de la planta se deja en el campo para la descomposición como fertilizante. Después de la recolección, la cápsula del algodón generalmente se comprime mecánicamente en módulos para su transporte a una planta de procesamiento llamado desmotadora de algodón.

En el proceso de desmotado de la cápsula del algodón, la fibra, para uso textil, se separa de la semillas y se comprime en Pacas de 217,7 kg (NCPA, 1999). La semilla separada en este punto se llama semilla difusa de algodón y representa aproximadamente el 60% de la cápsula del algodón. La semilla de algodón resultante o bien puede estar más lejos procesado o ser utilizado directamente como alimento para el ganado.

#### El procesamiento de la semilla de algodón difusa

La semilla de algodón difusa se procesa en cuatro productos principales: aceite, harina, cascarilla y fibra. Lista rendimientos típicos como el 45% de harina, 26% cascarilla, 16% de aceite, 9% linters y 4% de pérdida durante la elaboración.

La primera fase de la cadena se relaciona con la producción primaria en el campo. Una vez cosechado, el algodón se lleva a la despepitadora, donde se obtendrá la fibra para distribuirse a las empresas textiles que habrán de transformarla en productos de consumo. Los despepitadores producen dos productos primarios con valor comercial (algodón en pluma y semilla de algodón). La semilla de algodón eliminada durante el proceso es transportada a las fábricas de aceite de semilla de algodón. Las fibras cortas (borras) que no fueron removidas durante el proceso siguen adheridas a las semillas. En la fábrica de aceite, las borras de primer pase que son más largas se usan para producir ciertos tipos de telas y tejidos; las borras de segundo pase con fibras cortas se utilizan para producir papel bond de alta calidad y como fuente de celulosa en la industria química. La semilla limpia es convertida en aceite y grasas para consumo humano y subproductos para alimento de ganado, fertilizante y abono para plantas. Otro subproducto de la despepitadora son las motas, pequeñas semillas inmaduras con fibras adheridas que son utilizadas en productos no tejidos (Comité Sistema Producto Algodón, 2005).

Como puede observarse, el algodón es producido principalmente por su fibra, la cual es empleada como materia prima por la industria textil; pero los otros elementos del algodón también son utilizados por la industria y tienen un valor comercial. Por ejemplo, el aceite vegetal obtenido de la semilla de algodón es

utilizado para la cocina y la fabricación de jabones, y la torta de dicha semilla de algodón es muy apreciada por su alto contenido proteínico (24%) para usarse como alimento para animales y como fertilizante (Espinal et ál. 2005).

Aceite de semilla de algodón requiere procesamiento adicional para uso alimentario. El hidróxido de sodio se añade después de calentar y forma pasta oleosa o pie que se elimina por centrifugación. Tanto soapstock y el aceite crudo se utilizan para producir ácidos grasos. Para obtener aceite transparente, se añade la arcilla de blanqueo y se combina con el material colorante que puede ser separado del aceite por filtración. Estearina, un componente del aceite de semilla de algodón, se retira más lejos del aceite mediante la reducción de la temperatura a 3,3 - 4,4 °C, momento en el que la estearina cristaliza, se presta a separación por filtración. Todo el aceite de semilla de algodón se trata adicionalmente con vapor de agua bajo un vacío parcial para eliminar malos sabores. Esto produce un producto muy refinado y de calidad. Debido a su sabor superior la estabilidad, la mayor parte del aceite puro se utiliza como cocinar o aceite para ensaladas.

Debido a las duras condiciones utilizadas en el procesamiento de semilla de algodón, el aceite y las fibras contienen cantidades indetectables o insignificantes de proteína, por lo tanto, tanto el aceite como otros productos producidos a partir del algodón DAS 8191Ø 7 contendrán niveles extremadamente bajos de las proteínas AAD-12 y PAT.

### **e. Medio receptor (Anexo III 9 (h)): Información sobre la ubicación y las características geográficas, climáticas y ecológicas, incluida información pertinente sobre la diversidad biológica y los centros de origen del probable medio receptor.**

---

El algodón es un cultivo originario de las regiones tropicales de América, África, Asia sudoriental y Australia, su distribución abarca de los 42° Latitud Norte a los 32° Latitud Sur. Este cultivo se adapta a las regiones áridas y semiáridas con climas cálidos y semicálidos. Su ciclo vegetativo dura alrededor de 135 a 180 días, dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales. El cultivo del algodón (*G. hirsutum*) es a cielo abierto, y requiere de cuatro a cinco meses de temperaturas altas y constantes durante el crecimiento. La luminosidad es importante, especialmente durante los periodos de crecimiento inicial y floración. Las deficiencias de luz previenen la maduración y apertura de las cápsulas (CONABIO).

La germinación de la semilla se produce cuando se alcanza una temperatura no inferior a 14 °C, siendo el óptimo de germinación de 20 °C. Para la floración se necesita una temperatura media de los 20 a 30°C. Para la maduración de la cápsula se necesita una temperatura de entre 27 y 30 °C. En cuanto a la humedad

relativa óptima, el algodón es un cultivo exigente en agua, pues la planta tiene mucha cantidad de hojas provistas de estomas por las que se transpiran cuando hay un exceso de calor. Durante los periodos de crecimiento inicial y floración la luminosidad es especialmente importante ya que las deficiencias de luz previenen la maduración y apertura de las cápsulas (Ruiz-Corral et al., 1999)

Las características topográficas, físicas, químicas y de fertilidad de los suelos son importantes, pues todas ellas influyen en el rendimiento. En general, se recomienda el cultivo en terrenos con topografía plana o ligeramente ondulada. El algodón se adapta muy bien a casi todos los suelos pero los más convenientes son los de textura media: franco-arenosos finos, francos, franco-limosos y franco-arcillosos gruesos (Ruiz-Corral et al., 1999).

### **Capacidad invasiva**

No se ha reportado que las variedades cultivables de *G. hirsutum* presenten una capacidad invasiva importante. La hipótesis de que la introducción de genes de resistencia a las principales plagas, podría incrementar el potencial de la capacidad invasiva del algodón GM al modificar su adecuación comparado con variedades convencionales ha sido evaluada con estudios realizados por Eastick y Hearnden (2006) quienes demuestran que la capacidad invasiva, evaluada en términos de germinación, sobrevivencia y dispersión, no presentó diferencias con respecto a su contraparte convencional, aun en zonas de alto riesgo (zonas con humedad propicia para el establecimiento). Después de 2 años, la sobrevivencia fue muy baja. Los valores de invasividad varían para cada hábitat y para cada genotipo (INECC, Documento base de la especie *Gossypium hirsutum* L. para el análisis de riesgo ambiental).

En el caso del algodón Enlist Das-81910-7, como cualquier otro algodón, requiere de la intervención del hombre para poder persistir. Las semillas de *Gossypium hirsutum* normalmente requieren de alguna forma de tratamiento para asegurar una adecuada germinación. Los rasgos de interés introducidos por el evento DAS-81910-7, sólo permiten que el algodón GM sea diferente agronómicamente al algodón convencional en su tolerancia a los herbicidas 2,4-D y glufosinato de amonio.

### **Morfología y características**

El organismo receptor es la planta de algodón *Gossypium hirsutum*. *G. hirsutum* es un arbusto perenne que crece aproximadamente de 1.5 a 2 metros de longitud dependiendo de la variedad y de las condiciones ambientales. Sin embargo, en condiciones comerciales, las plantas de algodón crecen aproximadamente de 1 a 1.5 metros de longitud, y son plantas anuales que se destruyen después de la cosecha.

*G. hirsutum* presenta un tallo principal con crecimiento simpodial que soporta las ramas y hojas. Las ramas en el algodón se clasifican en dos tipos, ramas vegetativas o monopodiales, y ramas fructíferas o simpodiales. Las ramas vegetativas tienen un sólo meristemo que crece a lo largo, de forma recta y se ubican

en los primeros cinco nodos del tallo, mientras que las ramas fructíferas tienen múltiples meristemas con un hábito de crecimiento en zigzag y se presentan después del quinto nodo del tallo principal. Cada rama fructífera de longitud media produce entre 6 a 8 botones florales.

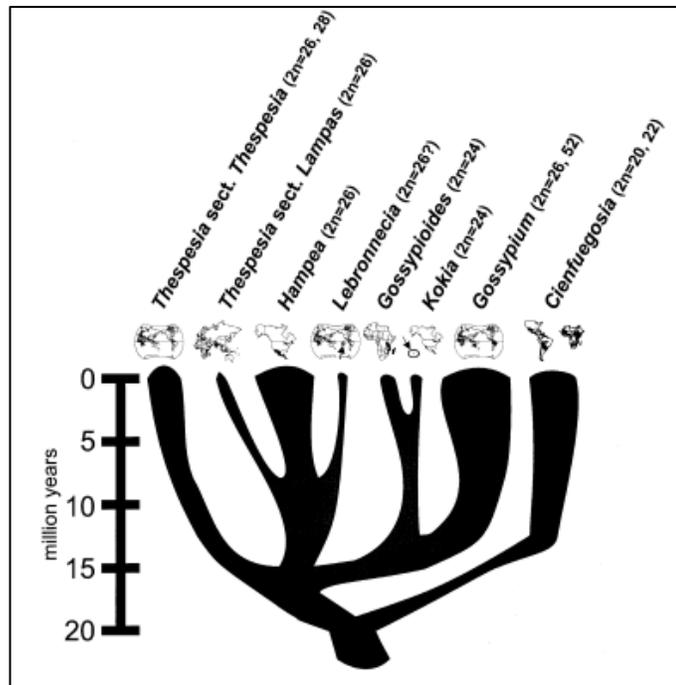
Las hojas en *G. hirsutum* presentan un arreglo en espiral alrededor del eje principal del tallo y de las ramas, son generalmente planas y siguen al sol para maximizar la adsorción de luz a través del día. La raíz de *G. hirsutum* es recta con crecimiento vertical, y de acuerdo a la edad, tamaño de la planta y el tipo de suelo, puede alcanzar una profundidad de 3 metros en condiciones óptimas. Las plantas de algodón tienen un hábito de crecimiento indeterminado, lo que significa que las plantas pueden desarrollar hojas, tallos, flores, frutos (cápsulas) y semillas, en un mismo periodo (Pérez et al, 2010).

### **El centro de origen del género *Gossypium***

El centro de origen del género *Gossypium* no se ha determinado. Sin embargo, se ha descrito que los centros primarios de diversidad biológica para este género son América central y Sudamérica con 18 especies, de las cuales 11 se encuentran en la zona centro oeste y el sureste de México y dos en Perú y las Islas Galápagos (una especie de Hawai conforma el grupo de América), el Noreste de África y Arabia con 14 especies, y Australia con 17 especies (CONABIO).

Estudios de secuencias de DNA de las especies de *Gossypium*, sugieren que el género se originó alrededor de 10 a 20 millones de años, separándose de los géneros *Kokia* y *Gossypioides* (**Error! Reference source not found.**), los grupos más cercanos dentro de la Tribu *Gossypiea* (Wendel & Albert 1992; Seelanan et al., 1997).

Los centros de domesticación para este género se ubican en África y el sur de Asia central, México y Sudamérica. De las especies descritas para este género, sólo cuatro se cultivan. Dos de estas especies, *G. herbaceum* y *G. arboreum*, son diploides; mientras que *G. barbadense* y *G. hirsutum* son tetraploides. La mayor parte del algodón cultivado deriva de dos especies, *G. hirsutum* (aproximadamente el 90% de la producción mundial) y *G. barbadense* (CONABIO; Wendel et al., 1994).

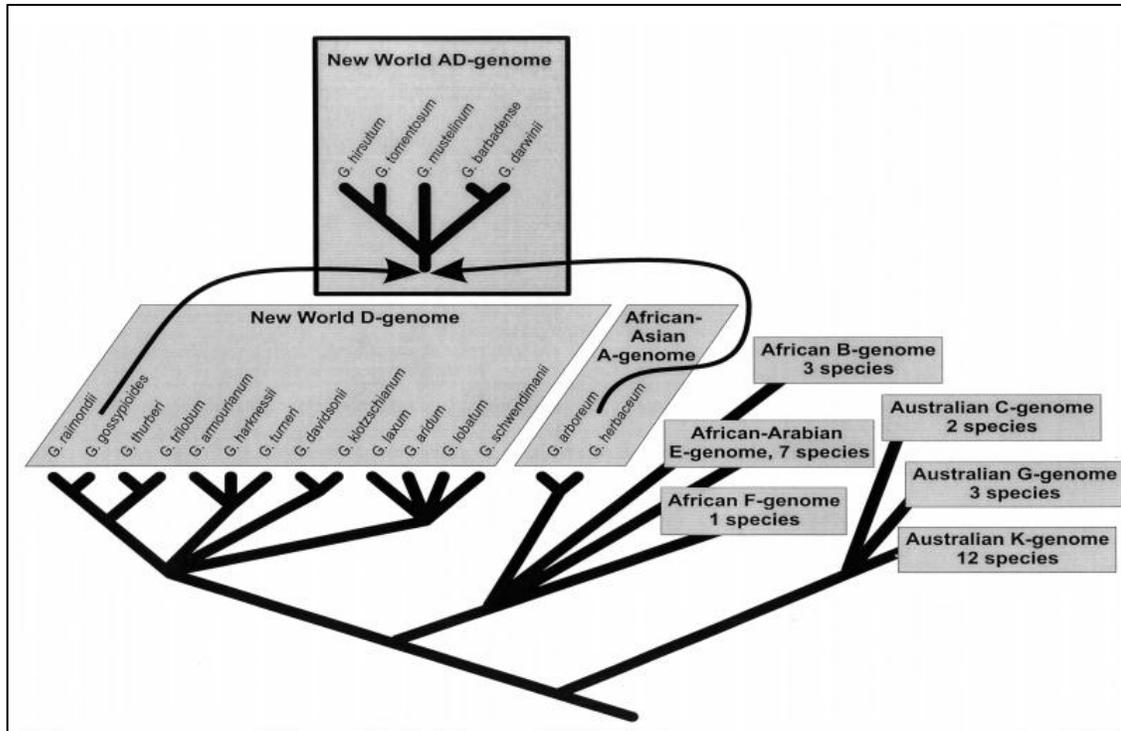


**Figura 3 .Relaciones filogenéticas en la Tribu de algodón (Gossypiae), según lo inferido por análisis moleculares (Seelanan et al., 1997).**

En la **Figura 3** El tamaño de las ramas es una escala aproximada del número de especies dentro del género y los números que siguen a los nombres genéricos indican la cuenta somática de cromosomas. La mejor evidencia disponible sugiere que la tribu tiene aproximadamente 20 millones de años de haberse originado y que *Gossypium* emergió alrededor de 12.5 millones de años.

El origen de las especies tetraploides cultivadas se remonta a alrededor de uno a dos millones de años, a partir de la hibridación de un taxón afro-asiático asociado al grupo genómico A, con un taxón asociado al grupo genómico D. Después de la poliploidización, el nuevo grupo AD dio origen a las especies tetraploides, incluyendo a *G. hirsutum*. En la **Error! Reference source not found.** se muestran las relaciones entre los grupos diploides originando los aloploiploides.

El centro de origen descrito para *G. hirsutum* es América Central y México, mientras que el posible centro de domesticación se localiza en el sureste de México, probablemente en la península de Yucatán durante el periodo precolombino (Brubaker & Wendel, 1994). La dispersión de estas formas de algodón al resto de Mesoamérica y Sudamérica presenta evidencias de que la población paso por un evento de cuello de botella, durante el cual se redujo la variabilidad genética como consecuencia de la presión de selección por la domesticación. Los genotipos seleccionados, con amplia similitud a las variedades actuales, comprenden reducción en la latencia de la semilla, hábito de crecimiento anual y fotoperiodo independiente de la floración (Iqbal et al, 2001).

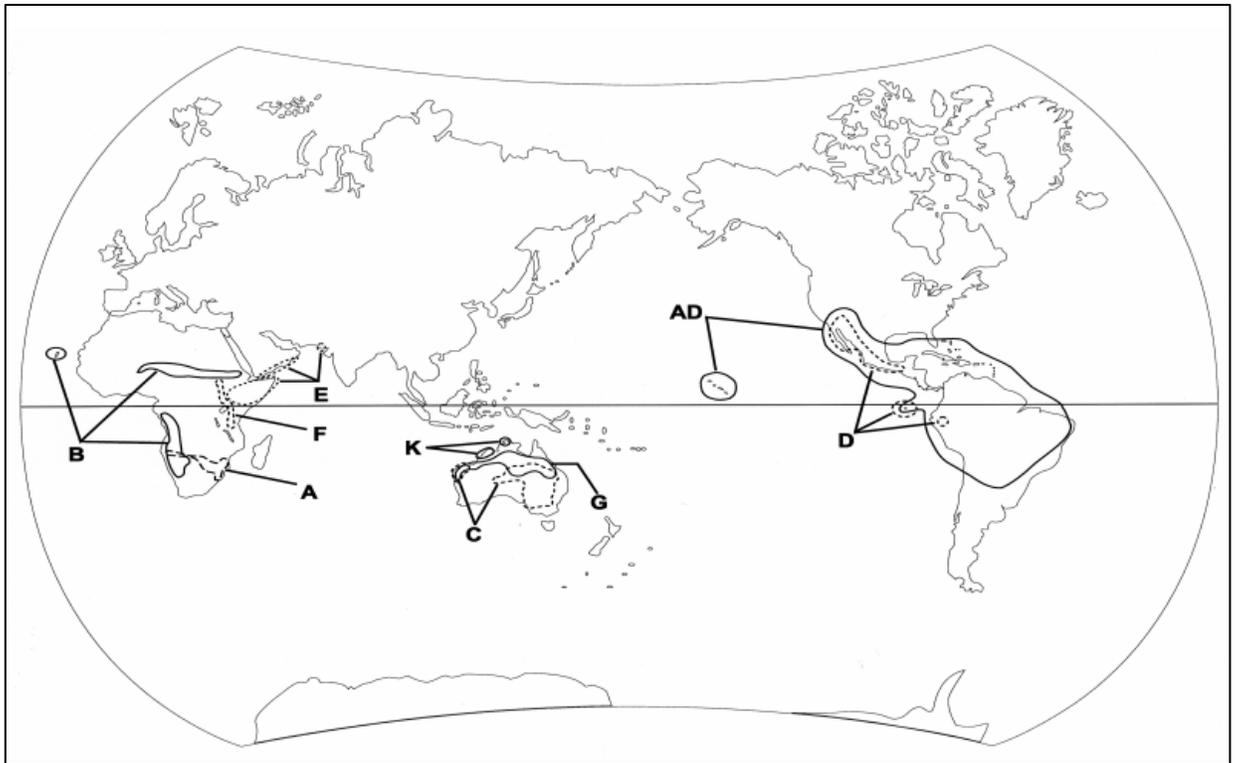


**Figura 4. Historia de la evolución de *Gossypium* (Brubaker & Wendel, 1994).**

La **Figura 4** muestra las relaciones entre grupos diploides como el origen de alopoliploides seguido de la hibridación inter-genómica.

La taxonomía del género ha sido bien estudiada. Las especies están agrupadas en 4 subgéneros y 8 secciones. Este sistema de clasificación está basado primordialmente en evidencia morfológica y geográfica, aunque la mayoría de los alineamientos infra genéricos son congruentes con los datos citogenéticos y moleculares (Wendel et al., 1994).

Actualmente, *Gossypium* incluye aproximadamente 50 especies, pero notablemente, nuevas especies continúan siendo descubiertas. El género es extraordinariamente diverso.



**Figura 5. Biogeografía del genoma de *Gossypium*.**

En esta **Figura 5**, se muestran la distribución geográfica y las designaciones genómicas.

Aunque todas las especies diploides comparten el mismo número de cromosomas ( $n = 13$ ), existe más del triple de variación en el contenido de DNA por genoma. La morfología de los cromosomas es similar entre especies cercanamente emparentadas, y esto está reflejado en la habilidad de las especies para formar híbridos que muestran emparejamiento de cromosomas normal durante la meiosis y en ocasiones una alta fertilidad en F1. Las observaciones colectivas del comportamiento de emparejamiento, el tamaño de los cromosomas y la relativa fertilidad en híbridos interespecíficos condujeron a la designación de cada genoma con símbolos de una sola letra para definir los grupos de especies. Actualmente se reconocen 8 grupos de genomas diploides (A al G, más el K). En la 5, se muestra la distribución geográfica de los grupos de genomas de *Gossypium*. Esta partición citogenética del género es ampliamente congruente con las divisiones taxonómicas y filogenéticas (Small & Wendell, 2000)

## **C. Uso previsto / Objetivo de la introducción del organismo vivo modificado y/o sus productos.**

---

Dow AgroSciences ha desarrollado el algodón DAS-8191Ø-7 tolerante a los herbicidas 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y glufosinato. El algodón DAS-8191Ø-7 ofrecerá a los productores mayor flexibilidad en la selección de herbicidas para un mejor control de malezas con importancia económica, permitiendo una ventana de aplicación mayor para el control efectivo de maleza; y proporcionar una solución efectiva para el manejo de resistencia en malezas.

El objetivo de la liberación en Costa Rica debido a sus condiciones adecuadas para la producción de este cultivo es para la multiplicación de semilla.

## **D. Información sobre la Evaluación del Riesgo**

---

### **a. Una identificación de cualquier característica genotípica y fenotípica nueva relacionada con el organismo vivo modificado que pueda tener efectos adversos en la diversidad biológica y en el probable medio receptor, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana (Anexo III 8 (a));**

---

Una evaluación comparativa de las características fenotípicas, agronómicas y ecológicas del algodón DAS-8191Ø-7 se realizó en comparación con aislina no transgénico (control). La caracterización del algodón DAS-8191Ø-7 abarcaba 1) crecimiento vegetativo, 2) ecológica (insectos y enfermedades) y 3) la germinación de semillas y la latencia.

En cada evaluación el algodón DAS-8191Ø-7 se comparó con un caso, aislina isogénica más cercana (control) que no contenían los genes AAD-12 y pat. El análisis fenotípico, agronómico y ecológico del algodón DAS-8191Ø-7 no reveló diferencias estadísticamente significativas entre el algodón DAS-8191Ø-7 sin aplicación y el algodón de la aislina (control). También se determinó que las características fenotípica, agronómicas y ecológicas del algodón DAS-8191Ø-7 aplicado con 2,4-D más glufosinato fue equivalente al algodón DAS-8191Ø-7 sin aplicación. Además, los estudios llevados a cabo en condiciones cálidas y frías revelaron que la germinación y la latencia del DAS-8191Ø-7 de algodón no difirieron significativamente de su algodón no transgénico comparador isogénico.

Los datos recogidos aquí apoyan la conclusión de que el algodón DAS-8191Ø-7, es sustancialmente equivalente al algodón no transgénico con la excepción de la introducción y la expresión de genes AAD-12 y pat por lo tanto no hay más probabilidades de representar un riesgo de plaga o tener un impacto ambiental significativo en comparación con el algodón no transgénico.

La principal fuente de alimento de algodón es el aceite de algodón refinado, que contiene cantidades indetectables de proteína (Reeves III y Weihrauch, 1979). Por lo tanto, la evaluación de la alergenicidad y toxicidad para los seres humanos de las proteínas expresadas en el algodón es menos relevante en comparación con otros cultivos como la soya, ya que poca o ninguna proteína está presente en productos de algodón consumidos. Independientemente, se llevó a cabo una evaluación detallada de la seguridad de AAD-12, para evaluar los posibles efectos adversos para los seres humanos o animales, derivados de la liberación al medio ambiente de los cultivos que contienen AAD-12 (Comisión del Codex Alimentarius, 2009). La evaluación de la seguridad de alimentos y piensos de AAD-12 expresa en el algodón DAS-8191Ø-7 considera varios factores, incluyendo la seguridad del organismo donante, historial de uso seguro, potencial alergénico, la toxicidad potencial y evaluación del riesgo alimentario basado en los patrones de consumo. La conclusión de la evaluación es que AAD-12, es poco probable que cause reacciones alérgicas en los seres humanos o ser una toxina para los seres humanos o animales.

Se llevó a cabo la evaluación de seguridad de la proteína PAT para evaluar los posibles efectos adversos para los seres humanos o animales derivados de la liberación al medio ambiente de los cultivos que contienen la proteína PAT (Comisión del Codex Alimentarius, 2009). La conclusión de la evaluación es que la proteína PAT es poco probable que cause reacciones alérgicas en los seres humanos o ser tóxicos para los seres humanos o animales.

La seguridad de fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) en los cultivos biotecnológicos se ha estudiado extensamente y liberación al ambiente de cultivos transgénicos que contienen PAT han sido aprobados por los organismos reguladores en once países diferentes participaron más de treinta y ocho eventos en ocho especies de plantas como el algodón, el maíz y la soja, entre otros cultivos (CERA - Fundación de Investigación ILSI, 2011). Numerosos cultivos transgénicos que expresan PAT han sido revisados por el USDA y la FDA sin preocupaciones identificadas (USDA, 1996; FDA, 1998, 2001; USDA, 2001; FDA, 2004a, 2004b, 2004c; USDA, 2004, 2005)

**b. Una evaluación de la probabilidad de que esos efectos adversos ocurran realmente, teniendo en cuenta el nivel y el tipo de exposición del probable medio receptor al organismo vivo modificado (Anexo III 8 (b));**

Las proteínas como clase generalmente no son tóxicas para los seres humanos, ni son propensas a acumularse en tejido adiposo o a persistir en el medio ambiente. Las proteínas usadas para la protección de cultivos, ya sean como aspersiones microbianas formuladas o como eventos biotecnológicos, no muestran toxicidad para los mamíferos y no corresponden con los alérgenos conocidos y son digeribles rápidamente.

Puesto que las proteínas AAD-12 y pat están contenidas dentro de la planta existe un potencial reducido de exposición humana a estas proteínas por las rutas de exposición dermal, ocular o por inhalación. Por lo tanto, no se requieren estudios de toxicidad aguda dermal, ocular y por inhalación para estas proteínas.

**c. Una evaluación de las consecuencias si esos efectos adversos ocurriesen realmente (Anexo III 8 (c));**

Resultados de las pruebas de campo confirman que las proteínas DAA-12 y PAT expresadas en DAS-8191Ø-7 de algodón proporcionan robusta tolerancia al 2,4-D y glufosinato respectivamente. No hay nuevas características fenotípicas en el algodón DAS-8191Ø-7 para indicar que es diferente de algodón convencional en el potencial de maleza y al igual que el algodón convencional, el riesgo de flujo de genes de DAS-8191Ø-7 de algodón para parientes silvestres en Costa Rica es negligible.

No se esperan impactos significativos que ocurran en las prácticas de manejo de cultivos actuales, en especies no objetivo ó especies en peligro, en la rotación de cultivos, o la gestión de control de plantas voluntarias de la introducción del algodón DAS-8191Ø-7. La disponibilidad del algodón DAS-8191Ø-7 tendrá un impacto beneficioso sobre las prácticas de control de malezas, proporcionando los cultivadores con otra herramienta para hacer frente a sus necesidades de control de malezas. La disponibilidad de DAS-8191Ø-7 de algodón permitirá a los productores a gestionar proactivamente las poblaciones de malezas, evitando cambios de población adversos de malas hierbas problemáticas o el desarrollo de resistencia.

Con la excepción de la presencia de las proteínas AAD-12 y Pat en el algodón DAS-8191Ø-7, es fenotípicamente equivalente al algodón cultivado comercialmente y no es más susceptible a enfermedades o plagas que el algodón cultivado comercialmente.

Pruebas de Campo y de laboratorio con el algodón DAS-8191Ø-7 demostraron que el algodón transgénico es sustancialmente equivalente al algodón no transgénico, aparte de la modificación prevista de la tolerancia a

herbicidas. DAS no conoce resultados de los estudios u otras observaciones que indicaran que habría consecuencias adversas de la introducción del algodón DAS-8191Ø-7

**d. Una estimación del riesgo general planteado por el organismo vivo modificado basada en la evaluación de la probabilidad de que los efectos adversos determinados ocurran realmente y las consecuencias en ese caso (Anexo III 8 (d));**

---

Los datos e información presentados confirman que el algodón DAS-8191Ø-7 es agrónomicamente, fenotípicamente y de composición, comparable al algodón no transgénico, con la excepción de la presencia de los genes AAD-12 y Pat. Por lo que es poco probable que el algodón DAS-8191Ø-7 suponga un aumento del riesgo como plaga, potencial de maleza o un impacto ambiental adverso en comparación con el algodón no transgénico. Estas conclusiones se basan en el resultado de los datos y la evaluación presentados en la solicitud y que incluyen lo siguiente;

- El algodón es un cultivo familiar que no posee ninguno de los atributos asociados comúnmente con las malas hierbas y tiene una larga historia de uso seguro.
- Estudio detallado de caracterización molecular del ADN insertado demostró una sola copia, intacta de la inserción de T-DNA dentro del genoma de algodón.
- Estudio detallado de caracterización bioquímica de las proteínas expresadas AAD-12 y PAT confirmó que es poco probable ser alérgenos o tóxicos. Además, PAT ha estado disponible comercialmente en cultivos incluyendo algodón, maíz, arroz, canola, soja y varios otros cultivos revisado previamente por el USDA.
- Evaluación de composición de la semilla de algodón confirmó el algodón DAS-8191Ø-7 es de composición equivalente al algodón no transgénico.
- Las evaluaciones fenotípicas, de caracterización agronómica y ecológica del algodón DAS-8191Ø-7 no demostró aumento de plagas de las plantas o potencial en maleza en comparación con el algodón no transgénico.
- Evaluación sobre el impacto potencial en especies no objetivo indicó que el algodón DAS-8191Ø-7 es poco probable que tenga efectos adversos en estos organismos en comparación con el algodón no transgénico.

- Prácticas de manejo agronómico actuales para el algodón concluyen que el algodón DAS-8191Ø-7, no es probable que cause un impacto prácticas agronómicas de algodón o uso de la tierra.

**e. Una recomendación sobre si los riesgos son aceptables o gestionables o no, incluida, cuando sea necesaria, la determinación de estrategias para gestionar esos riesgos (Anexo III 8 (e)); y**

---

La introducción de tolerancia a 2,4-D, glufosinato y glifosato en el algodón no alterará sus características para ser maleza. Las propiedades agronómicas del algodón DAS-8191Ø-7 relacionado con maleza, como la germinación, emergencia, vigor de las plántulas y la respuesta a factores de estrés ambientales han demostrado ser idéntico al algodón convencional. Si las plantas de algodón DAS-8191Ø-7 individuales fueron a pasar el invierno, todavía se pueden controlar con eficacia mecánica o con otros herbicidas con modos de acción diferentes como el paraquat en quema total, Atrazina para controlar las plantas voluntarias del algodón 2,4-D en los campos de maíz y Flumioxacina para el control de de plantas voluntarias de algodón tolerante al 2,4-D en los campos de soya (Morgan et al., 2011a). En conjunto, estos resultados apoyan la conclusión de que el Algodón DAS-8191Ø-7 de algodón no tiene una mayor proliferación de malas hierbas en comparación con el algodón cultivado comercialmente.

En general, el potencial del algodón DAS-8191Ø-7 en el cruce de cultivo con las poblaciones silvestres o nativas de algodón es bajo debido a la naturaleza de algodón auto-polinización, barreras de aislamiento geográfico y genético. Además, no se espera que el algodón DAS-8191Ø-7 para conferir una ventaja selectiva o aumentar el potencial como plagas de la progenie resultante de tales cruces si fueran a ocurrir. Por lo tanto, las consecuencias ambientales de flujo de genes del algodón DAS-8191Ø-7 para otras especies de algodón se consideran insignificantes.

**f. Cuando haya incertidumbre acerca del nivel de riesgo, se podrá tratar de subsanar esa incertidumbre solicitando información adicional sobre las cuestiones concretas motivo de preocupación, o poniendo en práctica estrategias de gestión del riesgo apropiadas y/o vigilando al organismo vivo modificado en el medio receptor (Anexo III 8 (f)).**

---

Con el fin de cumplir con los lineamientos y requisitos regulatorios, de Stewardship (Manejo responsable) y de EH&S (Environment, Health and Safety) de Dow AgroSciences (DAS), se han desarrollado Procedimientos Operativos Estándar (en lo sucesivo SOP) para todos los ensayos regulados de investigación

en campo, incluyendo aquellos realizados por terceros. Los SOP se han diseñado para cerciorar el confinamiento del material regulado y para minimizar la posible persistencia de estos materiales en el ambiente o la mezcla inadvertida con otros materiales vegetales durante el desarrollo de los estudios en campo.

### **Alcance**

El propósito de los Procedimientos Operativos Estándar (SOP por sus siglas en inglés) es asegurar el manejo apropiado de semillas y material vegetal transgénico regulado en las localidades de Dow AgroSciences y en otras localidades en donde se conduzcan ensayos en nombre de DAS.

A través de la correcta ejecución de los contratos de investigación con las organizaciones de investigación de campo, propietarios de la tierra y los agricultores.

- Durante el movimiento de las semillas y material vegetal entre las localidades de investigación de Dow AgroSciences y otras localidades.
- Después de la recepción en lugares de investigación de Dow AgroSciences y otras localidades.
- Durante el almacenamiento en lugares de investigación de Dow AgroSciences y otras localidades.
- A través del control de la deposición de polen adventicio y del movimiento involuntario de semilla propagativa.
- A través del manejo apropiado de los equipos de investigación de campo.
- Durante las actividades de siembra.
- A lo largo del ciclo de crecimiento reproductivo durante la temporada del cultivo.
- Durante las actividades de la cosecha, manual o con maquinaria.
- Durante la eliminación de las semillas transgénicas reguladas y material vegetal.
- A través del monitoreo y la destrucción de plantas voluntarias tras la finalización de una prueba en campo con transgénicos regulados.
- Durante inspecciones por el equipo de Cumplimiento en campo.
- Durante inspecciones por agencias gubernamentales.
- Durante el manejo adecuado de las preguntas de los medios de comunicación.

- Cuando se produce un incidente de cumplimiento, un incidente potencial de cumplimiento o se tiene la sospecha de un incidente de cumplimiento.
- Durante una visita de negocios por un socio o inspección del sector privado.

## **E. Sitios web en donde se puede acceder información detallada sobre la evaluación del riesgo o la manera en la que esta puede ser accesada y sitios web en donde pueda encontrarse información de liberaciones anteriores.**

---

- USDA –APHIS Petition for Determination of Nonregulated Status for Herbicide Tolerant DAS-81910-7 Cotton  
[https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/13\\_26201p.pdf](https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/13_26201p.pdf)
- Dow AgroSciences Company Petition for Determination of Nonregulated Status of 2,4-D- and Glufosinate-Resistant DAS-81910-7 Cotton  
[http://www.cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/decdocs/DAS819107/DAS819107\\_cotton\\_US\\_envt\\_ea.pdf](http://www.cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/decdocs/DAS819107/DAS819107_cotton_US_envt_ea.pdf)  
  
<http://www.cera-gmc.org/GmCropDatabaseEvent/DAS-81910-7/print>
- Dow AgroSciences LLC: Availability of a Preliminary Plant Pest Risk Assessment, Draft Environmental Assessment, Preliminary Finding of No Significant Impact, and Preliminary Determination of Nonregulated Status for Cotton Genetically Engineered for Resistance to 2,4-D and Glufosinate  
<https://www.federalregister.gov/articles/2015/05/28/2015-12817/dow-agrosciences-llc-availability-of-a-preliminary-plant-pest-risk-assessment-draft-environmental>
- U.S. Food and Drug Administration Biotechnology Consultation Note to the File BNF No. 000142  
[http://www.cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/decdocs/DAS819107/DAS819107\\_cotton\\_US\\_food\\_fed.pdf](http://www.cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/decdocs/DAS819107/DAS819107_cotton_US_food_fed.pdf)
- [Food derived from herbicide-tolerant cotton line DAS-81910-7](#)

United States Department of Agriculture

- [DAS-81910-7 Environmental Assessment](#)
- [DAS-81910-7 Final Determination](#)
- [DAS-81910-7 Finding of No Significant Impact](#)
- [DAS-81910-7 Plant Pest Risk Assessment](#)
- [Petition for Determination of Nonregulated Status for herbicide tolerant DAS-81910-7 cotton](#)

## F. Información Adicional

### a. Otra información que sea relevante o de interés.

#### Elementos Genéticos del ADN-T inserto del plásmido pDAB8264

Elemento genético	Posición		Longitud	Donante	Descripción
	Inicio del elemento	Fin del elemento			
<b>Region ADN-T</b>					
ADN-T Frontera B	1	24	24	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Transferencia de secuencias de ADN
Secuencia interpuesta	25	160	136	plásmido Ti pTi15955	Secuencia del plásmido Ti pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
RB7-MAR	161	1326	1166	<i>Nicotiana tobacum</i>	Región de unión a la matriz (MAR) de <i>Nicotiana tobacum</i> (Hall <i>et al.</i> , 1991)
Secuencia interpuesta	1327	1421	95	Plasmido pENTR/D-TOPO	Secuencia del plásmido pENTR/D-TOPO (Invitrogen Cat. No. A10465) y múltiples sitios de clonación.
AtUbi10	1422	2743	1322	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen poliubiquitina UBQ10 de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que comprende el promotor, la región 5' no traducida y el intrón (Norris <i>et al.</i> , 1993)
Secuencia interpuesta	2744	2751	8	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Secuencia usada para la clonación del ADN
aad-12	2752	3633	882	<i>Delftia acidovorans</i>	Versión sintética, optimizada para plantas del gen ariloxialcanoato dioxigenasa de <i>Delftia acidovorans</i> (Wright <i>et al.</i> , 2010a)
Secuencia interpuesta	3634	3735	102	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Secuencia usada para la clonación del ADN
AtuORF23	3736	4192	457	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Región no traducida 3' (UTR) que comprende el sitio de terminación de la transcripción y poliadenilación del marco abierto de lectura 23 (ORF23) del plásmido pTi15955 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia interpuesta	4193	4306	114	Plasmido pENTR/D-TOPO	Secuencia del plásmido pENTR/D-TOPO (Invitrogen Cat. No. A10465) y múltiples sitios de clonación.
CsVMV	4307	4823	517	virus del mosaico de la vena de yuca	Promotor junto con la región no traducida 5' derivada del Virus de Mosaico de la Nervadura de la Yuca (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996).
Secuencia interpuesta	4824	4830	7	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Secuencia usada para la clonación del ADN
pat	4831	5382	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Versión sintética, optimizada para planta del gen de la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT), aislado <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)
Secuencia interpuesta	5383	5484	102	plásmido pCRI2.1	Secuencia del plásmido pCRI2.1 (Invitrogen Cat. No. K205001) y múltiples sitios de clonación.
AtuORF1	5485	6188	704	<i>Agrobacterium</i>	Región no traducida 3' (UTR) que comprende el

				tumefaciens	sitio de terminación de la transcripción y poli-adeniación del marco abierto de lectura 1 (ORF1) del plásmido pTi15955 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Barker <i>et al.</i> , 1983).
Secuencia interpuesta	6189	6416	228	plásmido Ti C58	Secuencia del plásmido Ti C58 (Zambryski <i>et al.</i> , 1982; Wood <i>et al.</i> , 2001)
AND-T Frontera A	6417	6440	24	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Transferencia de secuencias de ADN
Secuencia interpuesta	6441	6459	19	Plásmido TiC58	Secuencia del plásmido Ti C58 (Zambryski <i>et al.</i> , 1982; Wood <i>et al.</i> , 2001)
AND-T Frontera A	6460	6483	24	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Transferencia de secuencias de ADN
Secuencia interpuesta	6484	6770	287	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Secuencia del plásmido Ti pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
AND-T Frontera A	6771	6794	24	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Transferencia de secuencias de ADN
<b>Region del esqueleto del plásmido</b>					
Elemento genético	Inicio del elemento	Fin del elemento	Longitud	Donador	Descripción
Secuencias del esqueleto del plásmido	6795	7173	379	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Secuencias del esqueleto del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Ori Rep	7174	8193	1020	plásmido RK2	Secuencias de origen de replicación del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Secuencias del esqueleto del plásmido	8194	8738	545	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Secuencias del esqueleto del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Trf A	8739	9887	1149	plásmido RK2	Secuencias de replicación del plásmido para la proteína Trf A a partir del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Secuencias del esqueleto del plásmido	9888	11091	1204	plásmido RK2	Secuencias del esqueleto del plásmido RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
Spec R	11092	11880	789		Secuencias de gen de resistencia a espectinomicina (Fling <i>et al.</i> , 1985)
Secuencias del esqueleto del plásmido	11881	12154	274	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Secuencias del esqueleto del plásmido para clonación