

SEGURIDAD DEL ALGODÓN BOLLGARD® EVENTO 531,
GENÉTICAMENTE PROTEGIDO
CONTRA LAS ORUGAS DE LAS CÁPSULAS



Monsanto Agricultura España, S.L.
Avda. de Burgos, 17 - 10ª plta.
28036 Madrid
Tel. 91 343 27 01 - Fax 91 343 27 27
www.monsanto.es



INDICE

Resumen	3
Introducción.....	7
Caracterización molecular del algodón Bollgard®.....	10
Niveles de proteína CryI Ac y NPTII en plantas de algodón Bollgard®	12
Evaluación de seguridad de las proteínas CryI Ac y NPTII en algodón Bollgard®	14
Análisis composicional y evaluación nutricional del algodón Bollgard®	20
Transferencia horizontal de genes y evaluación de genes marcadores	27
Evaluación sobre seguridad ambiental.....	30
Autorizaciones de Bollgard® en el mundo.....	37
Conclusiones	38
Referencias.....	39

RESUMEN

El algodón Bollgard, desarrollado por Monsanto y ensayado en campo desde 1992, produce una proteína para el control de insectos (CryIAC) derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.), presente naturalmente en el suelo. La producción de la proteína CryIAC en la planta de algodón otorga una protección eficaz, durante toda la campaña, contra plagas claves de insectos Lepidópteros para este cultivo (Wilson *et al.*, 1994; Betz *et al.*, 2000). Entre las plagas de algodón, contra las que Bollgard ofrece una protección eficaz, se encuentran las orugas de las cápsulas: *Helicoverpa armigera* (helióthis), *Pectinophora gossypiella* (gusano rosado) y *Earias insulana* (earias) (Novillo *et al.*, 1999), consideradas plagas de gran importancia agrícola para el algodón cultivado en España (Alvarado *et al.*, 1999).

En numerosos países en todo el mundo se han autorizado formulaciones microbianas de *B. thuringiensis* que contienen la proteína insecticida CryIAC, las cuales han sido utilizadas de manera segura para el control de plagas de insectos Lepidópteros durante más de 40 años (Luthy *et al.*, 1982; Baum *et al.*, 1999). La proteína CryIAC producida en el algodón Bollgard es prácticamente idéntica en estructura y actividad a la proteína CryIAC encontrada en la naturaleza y en formulaciones microbianas B.t.k. comerciales. *B. thuringiensis* y las formulaciones microbianas B.t.k. han demostrado ser específicas para las plagas a las cuales están dirigidas (insectos diana) y no tienen efectos nocivos para organismos no-diana como insectos y ácaros beneficiosos, pájaros, peces y mamíferos, incluyendo humanos (U.S. EPA, 1988; WHO, 1999).

Los beneficios directos del algodón Bollgard son el menor uso de insecticidas para protección del cultivo, un control de las orugas de las cápsulas más eficaz y en consecuencia una mejora del rendimiento, una reducción en los costes de producción y en los riesgos del cultivo, teniendo todo ello como resultado una mejora de la rentabilidad para los productores de algodón (ISAA, 2002; ISAAA, 2001; Edge *et al.*, 2001; Carpenter y Gianessi, 2001; Betz *et al.*, 2000; Economic Research Service/USDA, 2000; Falck-Zepeda *et al.*, 1998; Falck-Zepeda *et al.*, 2000; Fernandez-Cornejo y McBride, 2000; Gianessi y Carpenter, 1999; Klotz-Ingram *et al.*, 1999; Traxler y Falck-Zepeda, 1999; Xia *et al.*, 1999). Se ha estimado que el cultivo de algodón Bollgard en los Estados Unidos desde 1996, ha permitido una reducción de 1.2 millones de kg de ingredientes activos de insecticidas y 15 millones de aplicaciones de

insecticidas (Carpenter y Gianessi, 2001). Por otra parte, los productores de algodón de los Estados Unidos que cultivaron algodón Bollgard obtuvieron un aumento de 118 millones de kg en la producción de algodón por año, lo que supuso un incremento de sus ingresos netos en 1999 estimado en 100 millones de euros (Carpenter y Gianessi, 2001). Las revisiones más recientes sobre los beneficios derivados del cultivo de estas variedades de algodón confirman que siguen aportando una reducción significativa de ingredientes activos de insecticidas y un balance positivo para los agricultores (Gianessi *et al.*, 2002). Pero también el cultivo de variedades de algodón Bollgard ha aportado beneficios secundarios asociados a la reducción en el uso de insecticidas, que han dado como resultado un incremento de las poblaciones de insectos beneficiosos y fauna salvaje, una disminución en la escorrentía potencial de insecticidas y una mayor seguridad para los trabajadores agropecuarios (Pray *et al.*, 2001).

Bajo las condiciones ensayadas en España, las variedades Bollgard han demostrado ofrecer una excelente herramienta para el manejo integrado de plagas en algodón, reduciendo el consumo de recursos para proteger la cosecha de las orugas de las cápsulas: 10.7-15.8 l/ha de insecticidas no selectivos ahorrados, manteniendo o incrementando las producciones finales: 12% de incremento medio en ensayos durante 1998 y respetando las poblaciones de insectos auxiliares, que contribuyen a la lucha biológica contra las especies plaga del cultivo (Novillo *et al.*, 1999; Parrado *et al.*, 2001).

El algodón Bollgard, modificado genéticamente, se obtuvo transfiriendo el gen *cryIAc* al genoma de una variedad de algodón convencional, Coker 312, mediante *Agrobacterium tumefaciens* y utilizando como vector un plásmido. El gen *nptII*, que codifica una enzima seleccionable como marcador, la neomicina fosfotransferasa II (NPTII), estaba también presente en el plásmido para facilitar la selección de las plantas protegidas contra insectos. La proteína NPTII no sirve para ningún otro propósito y no tiene propiedades insecticidas. El plásmido también contenía el gen de resistencia a antibiótico *aad*, que codifica la enzima bacteriana seleccionable como marcador 3''(9)-O-aminoglicósido adeniltransferasa (AAD). Este gen confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina y facilitó la selección de las bacterias que contenían el plásmido, en los pasos iniciales de transformación del tejido de algodón. Está controlado por un promotor bacteriano, por lo que no se expresa en los tejidos del algodón.

Para la evaluación de la equivalencia nutricional y composicional del algodón Bollgard con respecto a las variedades convencionales de algodón, se realizaron más de 2.500 análisis separados sobre 67 componentes de la semilla y el aceite de algodón. Estos análisis incluyeron niveles de proteínas, grasas, humedad, calorías, minerales, aminoácidos, ácidos grasos ciclopropenoides y gopisol. Los resultados de estos análisis demuestran claramente que, salvo la producción de las proteínas CryIAc y NPTII, el algodón Bollgard es composicionalmente equivalente a y es tan seguro como las variedades de algodón convencionales, disponibles actualmente (Berberich *et al.*, 1996).

El siguiente resumen provee información sobre los métodos utilizados para desarrollar el algodón Bollgard, Evento 531, y un resumen de los estudios que avalan su seguridad como alimento humano, animal y medioambiental. Además de la caracterización molecular, se llevaron a cabo diferentes estudios para comprobar la seguridad de las proteínas producidas, la composición del alimento para uso humano y animal y su seguridad medioambiental. Los resultados de estas evaluaciones muestran que el algodón Bollgard y sus fracciones procesadas son substancialmente equivalentes al algodón producido convencionalmente, teniendo en cuenta la variación natural presente entre variedades de algodón, con la excepción de la expresión de las proteínas CryIAc y NPTII. También se demostró que las proteínas CryIAc y NPTII son seguras para el consumo humano y animal así como para el medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

El algodón es la principal planta cultivada para producción de fibra en el mundo y los insectos Lepidópteros son las plagas más importantes en la mayoría de las hectáreas de algodón cultivadas, incluido el algodón cultivado en España, que se localiza fundamentalmente en Andalucía. Así, el control de las orugas de las cápsulas en el algodón cultivado en Andalucía requiere un seguimiento muy detallado de las poblaciones de estas orugas y se estima que sólo la protección del cultivo frente a estas especies absorbe más de la mitad de todas las aplicaciones insecticidas a lo largo del ciclo del cultivo (Alvarado y Durán, 1996). La incorporación de la proteína CryI_{Ac}, de *B. thuringiensis*, dentro de las variedades de algodón Bollgard reduce, y en muchos casos elimina, la necesidad de aplicar insecticidas químicos para controlar las principales plagas de orugas de las cápsulas. El algodón Bollgard tiene valor no solo como un reemplazo de las aplicaciones de insecticidas contra plagas específicas, sino también como una herramienta en el manejo de plagas, que puede otorgar beneficios añadidos a la reducción en los costes del cultivo (Edge *et al.*, 2001; Wier *et al.*, 1998). Estos beneficios adicionales incluyen un menor riesgo para la salud del agricultor, un mayor respeto a los insectos auxiliares y la fauna salvaje y una perspectiva económica y de productividad más estable para la industria del algodón.



Las variedades Bollgard (izda) protegen la producción de fibra de los daños causados por las orugas de las cápsulas en sus variedades isogénicas (dcha)

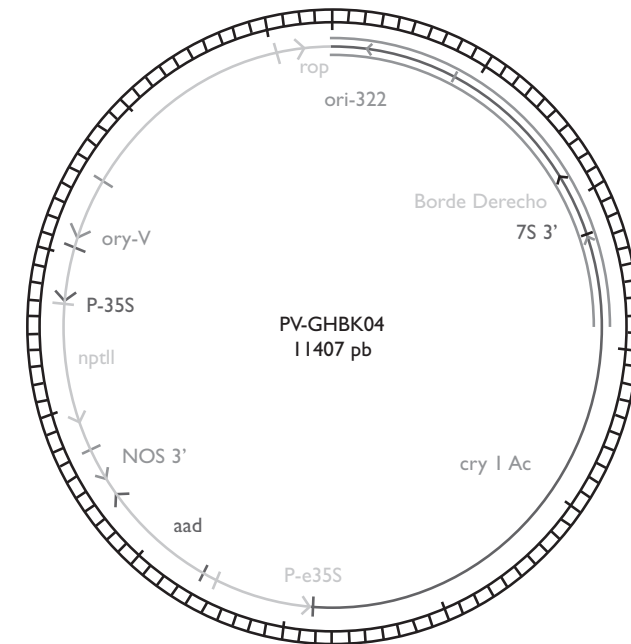
El algodón Bollgard fue producido utilizando una transferencia del gen *cryIAC*, mediada por *A. tumefaciens*, que codifica una proteína con actividad insecticida contra larvas de insectos Lepidópteros, dentro del genoma de algodón Coker 312. El cultivar Coker 312 fue utilizado debido a su respuesta favorable al sistema de cultivo de tejidos, utilizado en el proceso de obtención de plantas transgénicas. Pese a que Coker 312 no es una de las variedades más cultivadas actualmente, es aún un cultivar comercialmente aceptable. La característica Bollgard ha sido desde entonces transferida a diversas variedades comerciales de algodón, utilizando técnicas de mejora tradicionales.

El sistema de transformación con *A. tumefaciens* es bien conocido y ha sido utilizado durante muchos años en la modificación genética de diversas plantas dicotiledóneas. El plásmido vector fue modificado, de manera tal que el sistema de transformación no pudiera transmitir la enfermedad de la agalla de la corona. Este sistema de transformación integra genes del plásmido vector dentro del cromosoma de la célula de la planta, de forma estable. La caracterización molecular demostró que se integraron dos insertos de ADN-T (ADN transferido) dentro del genoma del algodón para producir Bollgard, evento 531. El gen *cryIAC* segregó de manera consistente con la presencia de una sola copia activa de la región codificante y se transfirió de forma estable, por técnicas de mejora tradicionales, a numerosas variedades comerciales de algodón.

El plásmido vector utilizado dentro de *A. tumefaciens* para producir el algodón Bollgard, evento 531, contiene la secuencia completa de los genes *cryIAC*, *nptII* y *aad* (Figura 1). El gen *cryIAC* deriva de la bacteria común del suelo *B. thuringiensis* variedad *kurstaki* (*B.t.k.*) y codifica la proteína insecticida, CryIAC. El cassette del gen *cryIAC* contiene un promotor e-35S y una secuencia de terminación transcripcional 7S 3'. El gen *nptII* codifica una enzima marcadora de selección, neomicina fosfotransferasa II (NPTII), utilizada para identificar las células de algodón que contenían la proteína CryIAC. El gen *nptII* está controlado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y está seguido por una región de nopalina sintasa (*nos*) 3' que dirige la poliadenilación del ARNm. La proteína NPTII no es útil para ningún otro propósito y carece de propiedades insecticidas. El gen *aad* codifica la enzima marcadora de selección bacteriana 3''(9)-O-aminoglicósido adeniltransferasa (AAD), que permitió la selección de las Agrobacterias, en medio que contenía

espectinomicina o estreptomycin. El gen *aad* está bajo el control de un promotor bacteriano, y por lo tanto, la proteína codificada no se expresa en las plantas derivadas del algodón Bollgard, evento 531.

Figura 1: Mapa del Plásmido PV-GHBK04



Los organismos donantes de genes incluyen el virus del mosaico de la coliflor (promotor e-35S), *A. tumefaciens* (terminador de nopalina sintasa), *E. coli* (*nptII* y *aad*) y soja (*Glycine max*; señal de terminación 7S 3'). El virus del mosaico de la coliflor y *A. tumefaciens* son fitopatógenos. *E. coli* es una bacteria gram-negativa, no-patogénica, utilizada para el clonado de ADN y la construcción del vector. Las características de los organismos donantes, el virus del mosaico de la coliflor y *A. tumefaciens*, no obligan a ningún ensayo analítico o toxicológico, ya que solamente se transfirieron al organismo huésped las secuencias de los genes específicos, que codifican las enzimas deseadas.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ALGODÓN BOLLGARD

La caracterización del algodón Bollgard, evento 531, demostró que hay dos insertos de ADN-T. El principal inserto funcional contiene copias únicas del gen completo de *cryIAc*, el gen *nptII* y el gen de resistencia a antibióticos *aad*. Este inserto de ADN-T también contiene una porción de 892 pares de bases del extremo 3' del gen *cryIAc* fusionado a la secuencia de terminación transcripcional 7S 3'. Este segmento de ADN se encuentra en el extremo 5' del inserto, en forma contigua y en orientación inversa al cassette del gen completo *cryIAc* y no contiene un promotor. Se detectó un transcrito por transcripción inversa RT-PCR, que corresponde a este segmento 3' del gen *cryIAc* y al ADN genómico adyacente. En la improbable eventualidad de que este ARN fuera traducido, el péptido resultante sería altamente homólogo a la porción correspondiente al C-terminal de la proteína CryIAC. La seguridad de esta proteína teórica se demuestra con los estudios descritos en las secciones siguientes, ya que la proteína, de ser producida, habría sido un componente en todos los estudios de seguridad llevados a cabo tanto con la proteína CryIAC, como con plantas o semillas de algodón Bollgard.

El segundo inserto de ADN-T contiene una porción de 242 pares de bases de la secuencia de poliadenilación 7S 3' de la región terminal del gen *cryIAc*. No se detectó transcrito de ARN por transcripción inversa RT-PCR, que se correspondiera o hubiera sido transcrito del inserto de ADN-T de 242 pares de bases 7S 3', por lo tanto no se produce ningún péptido, según lo esperado.

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

- Análisis por Southern blot de numerosas generaciones de algodón Bollgard, llevados a cabo durante los últimos ocho años, han dado como resultado un patrón de Southern blot idéntico, lo que indica la estabilidad del inserto funcional del gen *cryIAc*.

- Análisis ELISA de semilla obtenida de ensayos en múltiples localidades, durante ocho años, mostraron niveles similares de las proteínas CryIAC y NPTII.
- Se ha confirmado la producción de la proteína CryIAC por detección inmunológica y/o datos de eficacia bajo diferentes condiciones ambientales, en numerosas variedades de algodón Bollgard.
- Se observa herencia mendeliana de la característica Bollgard después de auto-polinización o retrocruzamientos con otras variedades de algodón.
- La eficacia insecticida se ha mantenido durante el desarrollo de este producto, desde su comercialización, en 1996, y en la producción total en unos 7 millones de hectáreas sembradas en Estados Unidos.
- La calidad de la semilla del algodón Bollgard se ha mantenido después de la transferencia del gen *cryIAc* dentro de distintos entornos genéticos.

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

NIVELES DE PROTEÍNA CryIAC Y NPTII EN PLANTAS DE ALGODÓN BOLLGARD

Las proteínas CryIAC y NPTII se producen en bajos niveles (partes por millón o $\mu\text{g}/\text{gr}$), en varios tejidos de la planta de algodón Bollgard. Los datos generados a partir de muestras recogidas en 1992 se presentan en las Tablas 1 y 2. Las proteínas CryIAC y NPTII se detectaron en el evento 531 y no fueron detectadas, según lo esperado, en la línea parental Coker 312. Los niveles medios de la proteína CryIAC, en 1992, fueron 1.56 y 0.86 $\mu\text{g}/\text{gr}$ peso fresco en hoja y semilla de algodón sin procesar, respectivamente. Los niveles medios de la proteína NPTII, en 1992, fueron 3.15 y 2.45 $\mu\text{g}/\text{gr}$ peso fresco, para hoja y semilla de algodón sin procesar, respectivamente. Las muestras de varias localidades, en ocho años de ensayos en campo, muestran niveles medios de la proteína CryIAC en semilla de algodón sin procesar que variaron de aproximadamente 1 a 9 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de peso fresco. En semilla de algodón sin procesar, el nivel medio de la proteína NPTII varió de 2.0 a 15 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de peso fresco entre las mismas localidades y años de ensayo en campo. Las proteínas CryIAC y NPTII están presentes en bajos niveles en plantas completas recolectadas justo antes de la defoliación. En ensayos en campo durante la campaña 1992, las plantas Bollgard maduras contenían unas cantidades estimadas de 0.08 μg CryIAC proteína/g y 3.3 μg NPTII proteína/g peso fresco de una planta madura completa (aproximadamente 10 μg de proteína CryIAC por planta). Dos años adicionales de datos, de las campañas 1998 y 1999, mostraron que los niveles de proteína CryIAC variaban desde <0.07 (límite de detección del ensayo) a 0.19 $\mu\text{g}/\text{gr}$ peso fresco. Los niveles de proteína CryIAC se mantuvieron suficientemente altos para un control efectivo de las plagas de insectos diana a lo largo de toda la campaña.

La proteína CryIAC no fue detectada en néctar recolectado de algodón Bollgard, utilizando un ensayo con un límite de detección de 1.6 ng/g (0,001 ppm) de peso fresco de néctar. La proteína CryIAC está presente en el polen a niveles por encima del límite de detección del ensayo utilizado para evaluar las concentraciones de la proteína CryIAC: 11.5 ng/g peso fresco de polen.

Después del procesado, los niveles de proteína CryIAC fueron reducidos a niveles no-detectables en la mayoría de los productos procesados de semilla de algodón: aceite refinado, fibras marrones y harina de semilla de algodón. La proteína CryIAC no fue detectada por ELISA o bioensayo con insectos, en la harina de semilla de algodón procesada. Se encontró que el contenido de proteína total en el aceite refinado de semilla de algodón estaba por debajo del límite de detección del ensayo (1.3 ppm). Se analizaron las fibras largas de la semilla de algodón Bollgard para medir

la presencia de la proteína CryIAC, utilizando análisis de western blot y bioactividad. La proteína CryIAC fue detectada a 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ peso de fibras sin procesar. Después del procesamiento de las fibras a fibras marrones o a fibras de algodón más purificadas, la proteína CryIAC no fue detectada a un límite de detección de 0.08 $\mu\text{g}/\text{g}$ peso.

La proteína AAD no fue detectada en tejido de hojas o semillas de algodón Bollgard al límite de detección de 0.008 y 0.005 $\mu\text{g}/\text{gr}$ peso fresco para hoja y semilla, respectivamente. Este resultado era predecible, ya que el gen *aad* está controlado por un promotor bacteriano y su expresión en la planta de algodón era improbable.

Tabla 1. Niveles de proteínas CryIAC, NPTII y AAD en tejido de hoja de algodón, en 1992 ($\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco).

Analizado	Coker 312 ^a	Línea 531 ^a
CryIAC media	ND	1.56
rango	NA	1.18-1.94
error std	NA	0.15
NPTII media	ND	3.15
rango	NA	2.46-3.84
error std	NA	0.270
AAD media	ND	ND
rango	NA	NA
error std	NA	NA

^a Media de niveles de expresión a lo largo de las localidades de ensayo en campo. N=36, 6 muestras por cada una de seis localidades
ND=no-detectable; NA=no aplicable

Tabla 2. Niveles de expresión de proteínas CryIAC, NPTII y AAD en semilla de algodón, en 1992 ($\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco).

Analizado	Coker 312 ^a	Línea 531 ^a
CryIAC media	ND	0.86
rango	NA	0.40-1.32
error std	NA	0.18
NPTII media	ND	2.45
rango	NA	1.97-2.93
error std	NA	0.19
AAD media	ND	ND
rango	NA	NA
error std	NA	NA

^a Media de niveles de expresión a lo largo de las localidades de ensayo en campo. N=36, 6 muestras por cada una de seis localidades
ND=no-detectable; NA=no aplicable

EVALUACIÓN DE SEGURIDAD DE LAS PROTEÍNAS CryI Ac Y NPTII EN ALGODÓN BOLLGARD

Las evaluaciones de seguridad de las proteínas CryI Ac y NPTII, expresadas en el algodón Bollgard, evento 531, incluyen la demostración de la falta de similitud con alérgenos y toxinas conocidos y la larga historia de consumo seguro de proteínas comparables, en formulaciones microbianas, digestión rápida en fluidos gástricos e intestinales simulados, modo de acción/especificidad de la proteína CryI Ac y la falta de toxicidad oral aguda en ratón.

Modo de Acción y Especificidad de la Proteína CryI Ac

La proteína CryI Ac es producida como un cristal insoluble en la bacteria *B. thuringiensis*. La proteína cristalizada está compuesta por la forma pro-toxina, de la proteína. La actividad insecticida de la proteína CryI Ac requiere que la proteína sea ingerida. En el intestino del insecto, la proteína se solubiliza debido al alto pH del intestino del insecto y es procesada proteolíticamente al núcleo activo de la proteína, que es resistente a mayor degradación por las proteasas del intestino del insecto. El núcleo de la proteína se une a receptores específicos en el intestino medio de insectos Lepidópteros, se inserta dentro de la membrana y forma poros ion-específicos (English y Slatin, 1992). De esta forma, interrumpe el proceso digestivo y causa la muerte del insecto. Los tejidos del sistema digestivo de insectos no-diana, mamíferos, pájaros y peces carecen de receptores que se unan a la proteína CryI Ac. Por lo tanto, la proteína CryI Ac no puede interrumpir la digestión y es, en consecuencia, no-tóxica para especies distintas a insectos Lepidópteros (Betz et al., 2000; Hofmann et al., 1988).

Caracterización e Historia del Consumo Seguro de las Proteínas CryI Ac y NPTII.

Existe un largo historial de uso seguro de la proteína CryI Ac en productos microbianos basados en productos *Bt* (U.S. EPA, 1988; WHO, 2000). La EPA y la WHO han reconocido el potencial de exposición dietaria a proteínas Cry a partir del uso de formulaciones microbianas en cultivos para uso alimenticio: “Los patrones de uso para *B. thuringiensis* pueden dar como resultado una exposición dietaria con posibles residuos de esporas bacterianas en materias primas agrícolas. Sin embargo, en ausencia de preocupaciones toxicológicas, no se espera riesgo por el consumo de materias primas agrícolas

tratadas, tanto para la población general como para bebés y niños” (U.S. EPA, 1998) “No se ha informado que *B.t.* cause efectos adversos en la salud humana cuando se encuentra presente en agua potable o alimentos” (WHO, 2000).

Basándose en la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante, se predijo la secuencia de aminoácidos de la proteína CryI Ac, expresada en el algodón Bollgard. La proteína CryI Ac producida en el algodón Bollgard es idéntica en >99.4% a la proteína producida por la cepa bacteriana *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*B.t.k.*). Cepas de *B. thuringiensis* han sido utilizadas de forma segura como insecticidas microbianos comerciales durante más de 40 años. Las proteínas Cry presentes naturalmente en *B.t.k.* han demostrado no tener efectos nocivos para peces, aves, mamíferos y otros organismos no-diana (U.S. EPA, 1988; Betz et al., 2000). La seguridad de las proteínas Cry para las especies no-diana se atribuye al modo de acción altamente específico y a la rápida digestibilidad.

La proteína NPTII expresada en el algodón Bollgard es similar química y funcionalmente a la proteína NPTII presente en la naturaleza (Fuchs et al., 1993).

Digestión de las Proteínas CryI Ac y NPTII en Fluidos Gástricos e Intestinales Simulados

Además de la falta de receptores para la proteína CryI Ac, la ausencia de efectos tóxicos en humanos y otros mamíferos se apoya en la rápida degradación de la proteína en un estudio de digestión gástrica *in vitro*. La velocidad de degradación de la proteína CryI Ac fue evaluada de forma separada en fluidos gástricos (pepsina, pH 1.2) e intestinales (pancreatina, pH 7.5) simulados: los fluidos gástricos e intestinales simulados fueron constituidos basándose en los niveles recomendados por la Farmacopea de Estados Unidos, 1995. La degradación de la proteína CryI Ac fue medida por análisis de western blot y bioactividad sobre insectos. El estudio demostró que la proteína CryI Ac se degrada en aproximadamente 30 segundos, desde el momento de la exposición al fluido gástrico (Betz et al., 2000). Las condiciones ácidas del estómago desnaturalizan la conformación nativa de la proteína CryI Ac, facilitando su rápida degradación. En fluidos intestinales, la proteína CryI Ac fue convertida a la forma estable a las proteasas y permaneció intacta y bioactiva durante al menos 21 horas. Este resultado era esperable, ya que es sabido que el núcleo proteico resistente a proteasas de las proteínas insecticidas *B.t.* es resistente a digestión adicional por tripsina.

In vivo, la proteína CryIAc estaría expuesta a condiciones gástricas antes de ingresar al lumen intestinal. Sería esperable que el bajo pH y la pepsina en el estómago digirieran completamente la proteína o la dejaran susceptible de digestión intestinal.

Se demostró que la proteína NPTII se degrada rápidamente bajo condiciones digestivas simuladas de mamíferos. Mediante análisis de western blot se evaluó la degradación de la proteína NPTII en fluidos digestivos, encontrándose que la actividad enzimática de la proteína NPTII desaparecía después de una incubación de 2 minutos en fluidos gástricos simulados y 15 minutos de incubación en fluidos intestinales simulados (Fuchs *et al.*, 1993).

Ausencia de Toxicidad Oral Aguda de las Proteínas CryIAc y NPTII en Ratón

Los resultados sobre toxicidad de proteínas muestran que pocas proteínas son tóxicas al ser ingeridas. Cuando las proteínas son tóxicas, se sabe que actúan por mecanismos agudos y a bajos niveles de dosis (Sjoblad *et al.*, 1992). Los resultados de estudios de toxicidad oral aguda en mamíferos apoyan la especificidad y seguridad de la proteína CryIAc. Cuando se administró proteína CryIAc en forma oral, a ratones (Betz *et al.*, 2000), no hubo evidencia de toxicidad aún a dosis extremadamente altas (4200 mg/kg peso corporal). Por lo tanto, la proteína CryIAc no es considerada tóxica, excepto para los insectos plaga diana. Además, no se espera que la proteína CryIAc producida en las plantas de algodón presente algún riesgo de toxicidad dermal o por inhalación. En primer lugar porque el nivel de expresión de la proteína CryIAc en algodón es bajo, y la proteína se encuentra dentro de las paredes celulares de los tejidos de la planta, con bajo o ningún potencial de exposición dérmica o inhalatoria. Y por otra parte, no se espera que las proteínas que no son tóxicas por la ruta oral lo sean por rutas dérmicas o pulmonares. De forma similar, la proteína NPTII no causó efectos nocivos en ratones cuando fue administrada, a través de cebos, a dosis de hasta 5000 mg/kg de peso corporal (Fuchs *et al.*, 1993).

Ausencia de Similitud de Secuencia de las Proteínas CryIAc y NPTII con Proteínas Tóxicas Conocidas.

Un método para la evaluación de potenciales efectos tóxicos de las proteínas introducidas dentro de plantas es comparar la secuencia de

aminoácidos de la proteína con la de proteínas tóxicas conocidas. Proteínas homólogas, derivadas de un ancestro común, tienen secuencias de aminoácidos similares, son estructuralmente similares y comparten funciones comunes. Por lo tanto, es indeseable introducir ADN que codifique para una proteína que sea homóloga a alguna toxina. La homología se determina por la comparación del grado de similitud de aminoácidos entre proteínas, utilizando criterios publicados (Doolittle *et al.*, 1990). La proteína CryIAc no muestra similitud de secuencia de aminoácidos significativa cuando se compara con proteínas tóxicas conocidas, presentes en las bases de datos de proteínas PIR, EMBL, SwissProt y GenBank, con la excepción de otras proteínas Cry. La proteína NPTII no muestra similitud de secuencia de aminoácidos significativa cuando se compara con toxinas proteicas conocidas, presentes en estas bases de datos de proteínas.

Evaluación de la Exposición de Humanos a Proteínas CryIAc y NPTII de Algodón Bollgard

Los únicos productos de algodón utilizados para alimento humano son el aceite de semilla de algodón y las fibras de algodón procesadas, (National Cottonseed Products Association, 1989). Los análisis de aceite refinado de semilla de algodón derivado de la línea parental Coker 312 utilizada como control y del algodón Bollgard, evento 531, confirmaron que no hay proteína detectable en aceite de semilla de algodón, a un límite de detección para el ensayo de 1.3 ppm, de proteína total. Esto es consistente con otros informes que concluyen sobre la ausencia de proteína en aceite de semilla de algodón (Cottonseed Oil, 1993). Análisis de fibras procesadas también confirmaron que no había proteína detectable (Sims *et al.*, 1996). Por lo tanto, el consumo humano significativo de las proteínas CryIAc y NPTII presentes en las variedades de algodón Bollgard es extremadamente improbable. Además, pruebas directas con individuos alérgicos a proteínas contenidas en la harina derivada de cultivos oleaginosos (ej soja, cacahuete y girasol) con el aceite de estos respectivos cultivos, han establecido que el aceite refinado no produce una respuesta alérgica (Bush *et al.*, 1985; Halsey *et al.*, 1986; Taylor *et al.*, 1981). Esto es consistente con la ausencia de proteína detectable en el aceite (Tattrie y Yaguchi, 1973). Esta información proporciona una base sólida para concluir que el aceite de semilla de algodón Bollgard no causa preocupación significativa sobre alergenidad, basándose solamente en la falta de exposición significativa.

Ausencia de Similitud de Secuencia de las Proteínas CryIAC y NPTII con Alergenos Conocidos

Pese a que no hay disponible un bioensayo predictivo único para medir el potencial alergénico de proteínas en humanos (U.S. FDA, 1992), el perfil fisicoquímico y de exposición humana de la proteína proporciona las bases para la medición del potencial alergénico, mediante la comparación con proteínas alergénicas conocidas. Por lo tanto, las consideraciones importantes que contribuyen a la alergenicidad de proteínas ingeridas oralmente incluyen exposición y una medición de los factores que contribuyen a la exposición, tales como estabilidad a la digestión, prevalencia en el alimento y patrones de consumo (cantidad) del alimento específico (Metcalf, *et al.*, 1996; Kimber *et al.*, 1999).

Un parámetro clave que contribuye a la alergenicidad sistémica de ciertas proteínas alimenticias es la estabilidad a la digestión gastrointestinal, especialmente estabilidad a proteasas ácidas como la pepsina que se encuentra en el estómago (Astwood *et al.*, 1996; Astwood y Fuchs, 1996; Fuchs y Astwood, 1996; FAO, 1995; Kimber *et al.*, 1999). Los alergenitos importantes tienden a ser estables a la digestión peptídica y a las condiciones ácidas del estómago, si es que van a alcanzar la mucosa intestinal donde se puede iniciar una respuesta inmune. Como se mencionó anteriormente, la medición *in vitro* de la digestibilidad de las proteínas CryIAC y NPTII mostró que estas proteínas son digeridas rápidamente.

Otro factor significativo, que contribuye a la alergenicidad de ciertas proteínas alimenticias, es su alta concentración en alimentos (Taylor *et al.*, 1987; Taylor, 1992; Fuchs y Astwood, 1996). Muchos alergenitos están presentes como componentes proteicos principales en el alimento específico, representando del 2-3% hasta el 80% de la proteína total (Fuchs y Astwood, 1996). Por el contrario, las proteínas CryIAC y NPTII están presentes en niveles bajos en las plantas de algodón Bollgard y no son detectables en los componentes del algodón que son utilizados para alimentación.

También es importante establecer que la proteína no representa un alergeno descrito previamente y que no comparte un segmento de una secuencia de aminoácidos con potencial de reacción cruzada o estructura con alergenitos conocidos. Una forma eficiente de determinar si la proteína

incorporada es un alergeno o es probable que contenga estructuras de reacción cruzada, es comparar la secuencia de aminoácidos con la de alergenitos conocidos. Se integró una base de datos de secuencias de proteínas asociadas con alergia y la enfermedad de los celíacos, a partir de bases de datos genéticas disponibles al público (GenBank, EMBL, PIR y SwissProt). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas CryIAC y NPTII fueron comparadas con estas secuencias, y ninguna mostró similitud de secuencia de aminoácidos significativa con los alergenitos conocidos (Astwood *et al.*, 1996).

Además, la proteína NPTII ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicinas de Estados Unidos (FDA) como aditivo útil en el procesamiento de tomate, algodón y canola (Administración de Alimentos y Medicinas, 1994), y está exenta del requerimiento de tolerancia como un ingrediente inerte por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA, 1994). Estas aprobaciones incluyen la evaluación de los potenciales efectos alergénicos para la proteína NPTII, y ambas agencias concluyeron que no había preocupaciones significativas.

En resumen, estos datos y análisis sustentan la conclusión de que las proteínas CryIAC y NPTII no son detectables en productos de algodón utilizados para alimento humano, no poseen un riesgo alergénico significativo, no derivan de fuentes alergénicas, no poseen similitud de secuencias inmunológicamente relevantes con alergenitos conocidos y no poseen las características de proteínas alergénicas conocidas como se resume a continuación. Esta conclusión está sustentada por la falta de antecedentes de sensibilización a las formulaciones microbianas comerciales y por las características de las proteínas Cry en cuanto a alergenicidad (McClintock *et al.*, 1995).

Características de proteínas alergénicas conocidas y las proteínas expresadas en el algodón Bollgard

Característica	Alergenos	CryIAC	NPTII
Estable a digestión	Si	No	No
Estable al procesamiento	Si	No	No
Similitud con alergenitos conocidos	Si	No	No
Proteína prevalente en alimentos	Si	No	No

Según se describe en Taylor (1992) y Taylor *et al.* (1987)

ANÁLISIS COMPOSICIONAL Y EVALUACIÓN NUTRICIONAL DEL ALGODÓN BOLLGARD

Para medir los niveles de nutrientes y antinutrientes claves en algodón, así como para evaluar si hubo algún cambio en estos componentes, comparándolos con los presentes en variedades convencionales de algodón, se llevaron a cabo análisis composicionales incluyendo el parental, a partir del cual se desarrolló el algodón Bollgard, como testigo. Estos datos, resumidos en las Tablas 3 a 8, demuestran que el algodón Bollgard es equivalente en su composición al algodón convencional.

Los análisis destinados a medir los componentes importantes para los usos como alimento humano y animal incluyeron:

- Análisis centesimal: proteínas, grasas, cenizas, agua, carbohidratos, calorías (Tabla 3).
- Perfil de ácidos grasos: contenido total de lípidos, porcentaje de ácidos grasos individuales (Tabla 4).
- Composición de aminoácidos: porcentaje de aminoácidos individuales (Tabla 5).
- Niveles de tres antinutrientes: gossipol, ácidos ciclopropenoides y aflatoxina (Tablas 6 y 7).

Los resultados de estos análisis (Tablas 3 a 6) demuestran que la semilla de algodón Bollgard es equivalente en su composición a, y es tan nutritiva como la semilla de la variedad de algodón parental y otras variedades comerciales de algodón (Berberich *et al.*, 1996).

Además de la semilla, el aceite refinado de algodón Bollgard también mostró ser equivalente al producido a partir de la variedad de referencia de algodón (Tabla 7). En el aceite refinado, se evaluaron los niveles del perfil de ácidos grasos (incluyendo ácidos grasos ciclopropenoides), contenido de gossipol libre y total, y niveles de tocoferoles. El perfil de ácidos grasos fue típico de un aceite de semilla de algodón comercial. El gossipol libre se redujo a niveles indetectables después del procesamiento y los niveles de tocoferoles fueron comparables a los niveles encontrados en aceite comercial de semilla de algodón.

Tabla 3. Análisis centesimal de semilla de algodón Bollgard, evento 531 y Coker 312 (Ensayos en campo 1993)

Componente	C312		Bollgard 531	Rango/valor medio publicado	Referencia bibliográfica
	Media ¹	(Rango) ^b			
Proteína %	27.00	(23.3-28.4)	27.56	18.8-22.9 23.5-29.5 12-32	Turner, <i>et al.</i> , 1976. Cherry, <i>et al.</i> , 1978a. Kohel, <i>et al.</i> , 1985.
Grasa %	22.96	(19.6-25.1)	23.23	23.2-25.7 21.4-26.8	Cherry, <i>et al.</i> , 1978b. Cherry, <i>et al.</i> , 1978a.
Ceniza %	4.63	(4.3-5.0)	4.53	4.1-4.9 3.8	Cherry, <i>et al.</i> , 1978b. Belyea, <i>et al.</i> , 1989.
Carbohidratos %	45.40	(42.8-47.6)	44.68	(3.9-4.7)	
Calorías / 100 g	496.32	(479-508)	498.11	(42.0-46.7)	
Humedad %	12.36	(9.6-15.9)	13.43	(495-511)	
				(11.2-14.7)	Cherry, <i>et al.</i> , 1978a.

^a Proteína, grasa, ceniza, carbohidratos y calorías citadas como porcentaje de peso seco por muestra.

^b Los rangos indican los valores individuales menores y mayores, a través de las localidades, para cada cultivar o evento.

¹ El valor indicado es la menor media cuadrada de cinco muestras, una de cada localidad de ensayo donde fue recolectado un volumen de semilla del cultivar C312.

² El valor indicado es la menor media cuadrada de cuatro muestras, una de cada localidad de ensayo donde fue recolectado un volumen de semilla del cultivar de algodón Bollgard, evento 531.

Sin diferencias estadísticas significativas con el testigo, Coker 312.

Tabla 4. Composición de lípidos y ácidos grasos en Bollgard, evento 531, y Coker 312 (Ensayos en campo 1993)

Componente	C312 ^{a,b}		Bollgard 531 ^{a,b}	
	Media	Rango ^c	Media	Rango
Lípidos	33.5	30.9-35.5	33.5	30.8-35.9
Mirístico (14:0)	0.94	0.67-1.07	0.88	0.75-0.98
Pentadecanoico (15:0)	0.40	0.32-0.60	0.62	0.32-0.90
Palmitico (16:0)	26.5	24.8-27.8	26.3	25.1-27.2
Palmitoleico (16:1)	0.64	0.48-0.71	0.61	0.54-0.64
Margárico (17:0)	0.16	0.13-0.20	0.18	0.14-0.27
Esteárico (18:0)	2.63	2.32-3.26	2.90	2.71-3.26
Oleico (18:1)	15.3	14.8-16.0	16.8	14.8-19.1
Linoleico (18:2)	47.8	46.4-49.9	45.6	41.6-49.0
Linolénico (18:3)	0.20	0.13-0.29	0.14	0.13-0.18
Araquídico (20:0)	0.29	0.26-0.31	0.28	0.22-0.33
Behénico (22:0)	0.15	0.12-0.17	0.14	0.13-0.15
Malválico (C-17)	0.37	0.22-0.45	0.38	0.23-0.47
Estercúlico (C-18)	0.59	0.48-0.70	0.62	0.54-0.69
Dihidoestercúlico (C-19)	0.36	0.29-0.50	0.49	0.24-0.84

^a El valor de los lípidos se expresa como % de peso de muestra seca. El valor de ácidos de ácidos grasos se expresa como % de los lípidos totales.

^b Los valores representados son la menor media cuadrada y los rangos de cinco muestras para C312 y cuatro muestras del evento Bollgard 531.

^c El rango indica los valores individuales menores y mayores, a través de las localidades para cada variedad. No hay diferencias estadísticas significativas con el testigo Coker 312.

Tabla 5. Composición de aminoácidos[†] en semilla de algodón Bollgard, evento 531, y Coker 312 (Ensayos en campo, 1993).

Aminoácido	Bibliografía		C312 ²	Bollgard 531 ³
	Max ¹	Min ¹		
Acido Aspártico	9.5	8.8	9.72	9.49
Treonina	3.2	2.8	3.40	3.42
Serina	4.4	3.9	4.62	4.67
Acido Glutámico	22.4	20.5	19.56	18.21*
Prolina	4.0	3.1	4.22	4.03
Glicina	4.5	3.8	4.32	4.18
Alanina	4.2	3.6	4.12	4.03
Cisteína	3.4	2.3	1.60	1.68
Valina	4.7	4.3	4.50	4.09*
Metionina	1.8	1.3	1.48	1.94*
Isoleucina	3.4	3.0	3.26	3.02*
Leucina	6.1	5.5	5.98	5.93
Tirosina	3.3	2.8	2.92	3.08*
Fenilalanina	5.6	5.0	5.32	5.28
Lisina	4.1	3.9	4.50	4.73*
Histidina	2.8	2.6	2.72	2.94*
Arginina	12.3	10.9	11.20	11.68
Triptófano	1.4	1.0	1.04	1.00

[†] La composición de aminoácidos se expresa como mg/kg de peso seco de proteína en la semilla de algodón.
¹ Lawhon, 1977 (solo pudo citarse una referencia relevante, lo que da como resultado un rango menor para la comparación, que probablemente no sea representativo de la variación en niveles de aminoácidos entre distintas variedades de algodón).

² El valor indicado es la menor media cuadrada de cinco muestras, una de cada localidad de ensayo donde se recolectó un volumen de semilla del cultivar C312.

³ El valor indicado es la menor media cuadrada de cuatro muestras, una de cada localidad de ensayo donde se recolectó un volumen de semilla del evento Bollgard 531.

* Diferencia significativa del cultivar testigo C312, a un nivel de 5% (t-test apareado). Datos de años adicionales han demostrado que estas diferencias no son consistentes a lo largo de los años y en diferentes entornos genéticos, indicando que las diferencias observadas en 1993 no son atribuibles a la característica genética.

Tabla 6. Niveles de aflatoxina y gosispol determinados en semilla de algodón Bollgard, evento 531 y Coker 312 (Ensayos en campo, 1993)

Variedad	% Gosispol Total [†]		Aflatoxina
	Media ^a	Rango ^b	
C312	1.16	(0.97-1.43)	ND
Bollgard 531	1.10	(0.86-1.29)	ND

[†] El gosispol se expresa como porcentaje del peso seco de la semilla; el rango en la bibliografía es 0.39 – 1.7% (Berardi y Goldblatt, 1980)

^a Los valores citados para las muestras de semillas son la menor media cuadrada (procedente de análisis estadísticos).

^b Los rangos representan los valores menores y mayores entre seis muestras por variedad, una muestra por localidad donde se recolectó un volumen de muestras de semilla.

ND = No detectado al límite de detección de 1 ppb

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos de aceite refinado de algodón Bollgard, Evento 531 y Coker 312 (Ensayos en campo, 1993).

Ácidos Grasos	Rango en bibliografía	Aceite Refinado (% de ácidos grasos totales)	
		Coker 312	Bollgard 531
Mirístico (14:0)	(0.5-2.5) ¹ (0.68-1.16) ²	0.98	0.77
Palmitico (16:0)	(17-29) ¹ (21.63-26.18) ²	25.42	25.08
Palmitoleico (16:1)	(0.5-1.5) ¹ (0.56-0.82) ²	0.64	0.58
Estearico (18:0)	(1.0-4.0) ¹ (2.27-2.88) ²	2.53	2.67
Oleico (18:1)	(13-44) ¹ (15.17-19.94) ²	14.92	15.89
Linoleico (18:2)	(33-58) ¹ (49.07-57.64) ²	50.27	50.88
Linolénico (18:3)	(0.1-2.1) ¹ , (0.23) ³	0.16	0.17
Araquídico (20:0)	(<0.5) ¹ , (0.41) ³	0.21	0.30
Behénico (22:0)	(<0.5) ¹	0.12	0.13
Malválico (C-17)	(0.22-1.44) ⁴	0.36	0.46
Estercúlico (C-18)	(0.08-0.56) ⁴	0.48	0.43
Dihidroestercúlico (C-19)	NA	0.22	0.16
Gosipol total	0.01% (1 ppm) ²	0.09	ND
Gosipol libre	0.01% (1 ppm) ²	ND	ND
α -Tocoferol ⁵	136-660 ⁶	638	568

¹ Rangos adoptados por el Comité del Codex Alimentarius FAO/WHO en grasas y aceites (Cottonseed oil, 1993).

² Cherry y Leffler, 1984

³ Cherry, J.P., 1983

⁴ Cottonseed oil, 1993. Valores citados para aceite de semilla de algodón crudo.

⁵ α -Tocoferol citado como mg/kg de aceite

⁶ Rossel, 1991; Dicks, 1965

ND = No Detectado, NA = No Disponible

Se evaluó el contenido de gosipol libre y total en harina de semilla de algodón tostada. Después del tostado, el gosipol libre se redujo a niveles aceptables para uso alimenticio animal, tanto en las variedades de algodón Bollgard como en las convencionales. El contenido total de gosipol estuvo dentro de los rangos aceptables para permitir que la harina sea utilizada como un suplemento proteico para alimento animal (Tabla 8). Las fibras cortas asociadas a la semilla después del desmotado, están compuestas principalmente de celulosa y son altamente procesadas tanto para usos químicos como no-químicos. Los rendimientos de las fibras cortas del algodón Bollgard fueron comparables a aquellos del testigo y a los rangos citados para otras variedades de algodón (Tabla 9). Por lo tanto, la inserción del ADN, incluyendo la secuencia codificante de CryIAC, en el genoma del algodón, no alteró las características del procesamiento de la semilla de algodón.

Tabla 8. Niveles de gosipol libre y total determinados en harina de semilla de algodón cruda y harina tostada de algodón Bollgard, evento 531, y Coker 312*

	% Gosipol Total	% Gosipol Libre
Harina Cruda		
C312	1.06	0.667
Bollgard 531	1.05	0.687
Harina Tostada		
C312	1.11	0.011
Bollgard 531	0.87	0.008

* Los valores fueron obtenidos de análisis de una muestra que incluía semilla de todas las localidades de ensayo donde se recolectó un volumen de semilla de algodón en el ensayo en campo durante 1993.

Tabla 9. Rendimiento de fracciones de fibras de semillas de algodón procesadas

	Rendimiento (lbs)	% Rendimiento	% Rendimiento para Cultivares
C312	5.3	11.8	9.9-12.4 ¹ , 8.4 ²
Bollgard 531	7.5	14.7	

¹ Cherry y Leffler, 1984

² Cottonseed y its Products, 1989

En resumen, puede concluirse que tras realizar un análisis detallado de la composición del algodón Bollgard, evento 531 (Berberich *et al.*, 1996), no hay diferencia significativa cuantitativa o cualitativa entre éste y el cultivar de algodón a partir del cual fue desarrollado, o valores citados para otras variedades comerciales, con respecto a los nutrientes tales como proteína total, grasa, fibra, ceniza y aminoácidos. Por lo tanto, el valor nutricional de la semilla de algodón Bollgard es sustancialmente equivalente a otras variedades de algodón, disponibles actualmente.

Además de los estudios de composición, se demostró la calidad nutricional de la semilla de algodón Bollgard alimentando ratas e incorporándola a la dieta de vacas lecheras que contenía semilla de algodón cruda, tanto del algodón Bollgard, como de cultivares de algodón convencionales utilizados como testigo. Cuando finalizó el estudio en ratas, no hubo diferencias significativas en ganancia de peso o incorporación de alimento entre aquellas que consumieron algodón Bollgard y la dieta de algodón control (Tabla 10). Los resultados del estudio con vacas lecheras mostraron que la semilla de algodón Bollgard se comportó de forma comparable a la semilla de algodón control. No se encontraron diferencias significativas en el rendimiento de la leche, composición y condición corporal de las vacas (Castillo *et al.*, 2001). Además, el algodón Bollgard ha sido cultivado comercialmente en más de 7 millones de hectáreas, desde 1996, sin que se hayan citado diferencias en el comportamiento como alimento animal.

Tabla 10. Resumen de ganancia de peso en ratas durante un mes de estudio alimenticio con harina de semilla de algodón Bollgard*

		Peso Corporal Macho/g		Peso Corporal Hembra/g	
		Pre-test	28 días	Pre-test	28 días
C312	Media	174.5	321.9	140.0	191.9
	Desv. Std.	10.29	18.87	6.51	10.31
	Tamaño Muestra	10	10	10	10
Bollgard 531	Media	174.8	323.8	140.9	189.3
	Desv. Std.	10.38	14.39	8.15	10.31
	Tamaño Muestra	10	10	10	10

* Concentración en la dieta de aproximadamente 10%

TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES Y EVALUACIÓN DE GENES MARCADORES

La transferencia horizontal de genes se define como la transferencia de ADN desde una especie hacia otra. Con respecto a plantas cultivadas que se hayan desarrollado gracias a la biotecnología, se han llevado a cabo diversas evaluaciones para evaluar la posibilidad de que los genes marcadores de resistencia a antibióticos, utilizados para facilitar la selección de las plantas transformadas, puedan ser transferidos, ya sea a bacterias en el campo, o a animales que hayan consumido el cultivo. La razón para esta evaluación es que algunas especies de bacterias encontradas en el suelo, en el rumen o en el intestino pueden recibir ADN de otros organismos, a través de tres mecanismos de transferencia (Morrison, 1996; Davison, 1999). Sin embargo, solamente un mecanismo, la transformación, es relevante para la posible transferencia de ADN desde plantas hacia bacterias y la subsiguiente expresión del producto proteico codificado. Los otros dos mecanismos, conjugación (intercambio de ADN plasmídico entre bacterias compatibles) y la transducción (transferencia viral de ADN dentro de bacterias) son específicos de formas de transferencia restringidas y no son relevantes para la potencial transferencia de ADN desde plantas (Thomson, 2000). En general, las especies de bacterias difieren marcadamente en su habilidad para aceptar ADN del ambiente, y la frecuencia de transformación, aún bajo circunstancias ideales, es muy baja. El ADN que fue transferido dentro del algodón para producir algodón Bollgard, fue incorporado al ADN genómico de la planta y representa una pequeña fracción del genoma del algodón. La probabilidad de que una bacteria tome los genes marcadores de la transformación es la misma para cualquier otra pieza de ADN de la planta, elegida al azar.

Transferencia Horizontal de Genes en el Campo

Los factores que afectarían a la posible transferencia horizontal de genes entre plantas modificadas genéticamente expresando genes marcadores de resistencia a antibióticos y microorganismos, en el medio ambiente, han sido estudiados extensamente (Prins y Zadoks, 1994; Schlüter *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1998; Smalla *et al.*, 2000). Hasta la fecha, no hay evidencia experimental de que un gen marcador de resistencia a antibióticos de una planta haya transformado una bacteria, tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Broer *et al.*, 1996; Schlüter *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1997). Muchas bacterias en ambientes naturales no son competentes para aceptar

ADN. Aún bajo condiciones de laboratorio, estudios diseñados específicamente para detectar la transferencia de genes marcadores funcionales, desde plantas hacia bacterias, han fracasado en demostrar este suceso.

Transferencia horizontal de Genes desde Productos Alimenticios Humanos y Animales

Además de los ensayos en el medio ambiente, varios estudios han medido el potencial de transferencia horizontal de genes marcadores de resistencia a antibióticos, desde plantas transgénicas a la microflora en el intestino de humanos, rumiantes y otros animales. La probabilidad de que este acontecimiento ocurra es virtualmente cero (Prins y Zadoks, 1994; Schlüter *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1998; Beever y Kempe, 2000; Montesinos y Badosa, 2002).

Si un gen marcador fuera transferido, una pregunta importante sería si añadiría un riesgo más, teniendo en cuenta la abundancia de bacterias resistentes a antibiótico. Recientemente, Smalla *et al.*, (2000), publicaron una minuciosa revisión del peligro potencial asociado con la transferencia horizontal de genes de un marcador de resistencia a antibióticos desde plantas a microorganismos y concluyeron que “es improbable que los genes de resistencia a antibióticos utilizados como marcadores en cultivos transgénicos contribuyan significativamente a la diseminación de resistencia a antibióticos en poblaciones bacterianas”. Como tal, el riesgo asociado a un marcador de resistencia a antibióticos en un cultivo modificado es considerado mínimo.

El algodón Bollgard contiene dos genes marcadores de antibióticos, *aad* y *nptII*. El gen *aad* fue aislado del transposón Tn7 que se encuentra comúnmente en bacterias gram-negativas (Shaw *et al.*, 1993). Si una bacteria del intestino adquiriese el gen *aad*, no tendría ventaja selectiva en ausencia de espectinomicina o estreptomycin. La proteína AAD es común en la naturaleza y por lo tanto, consumida como parte de nuestra dieta natural. Aún si la proteína AAD estuviera presente en el intestino, no comprometería la eficacia terapéutica de estos antibióticos, ya que la enzima AAD necesita cofactores específicos, en concentraciones apropiadas, para funcionar, y éstos no se encuentran en el intestino. Se han revisado bases de datos de secuencias de

proteínas comparándolas con la secuencia de aminoácidos de AAD, sin encontrar similitudes con toxinas o alérgenos conocidos (Kärenlampi, 1996). El gen *nptII* fue aislado del transposón Tn5, el cual se encuentra en varias bacterias gram-negativas, incluyendo cepas que colonizan naturalmente el intestino humano (Kärenlampi, 1996). Adicionalmente, si el gen *nptII* fuera transferido a una bacteria, no sería expresado, salvo que se integrase dentro de la región que contenga un promotor bacteriano, ya que el gen *nptII* está regulado por un promotor vegetal.

El origen de replicación *ori322*, para mantener un alto número de copias del plásmido PV-GHBK04 en *E. coli*, que fue utilizado para la transformación, no fue transferido dentro del genoma de la planta de algodón. Por lo tanto, los genes de resistencia a antibióticos en el algodón Bollgard no pueden movilizarse por escisión del gen marcador con otro inserto, para crear un plásmido funcional. El ADN debería integrarse dentro del genoma o plásmido del recipiente para poder replicarse y ser transferido a través de la reproducción.

La pregunta de la transferencia de genes de resistencia a antibióticos marcadores ha sido recientemente discutida en detalle por expertos científicos de la Unión Europea en relación con una solicitud para comercializar un maíz protegido contra insectos bajo la Directiva 90/220, en un seminario organizado por la Comisión de Ingeniería Biomolecular y la Comisión de Ingeniería Genética. La Comisión Europea solicitó la opinión de tres Comités Científicos, los cuales se centraron en particular en los riesgos de transferencia del gen *bla*, que confiere resistencia a ampicilina a bacterias, en el tracto gastro-intestinal de humanos y animales. El comité científico concluyó que “(a) la posibilidad de transferencia de una construcción funcional con el gen *bla* es virtualmente cero y (b) que si el virtualmente imposible hecho ocurriera, no sería clínicamente significativo” (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/oldcomm6/out01_en.html). Una conclusión similar fue obtenida por Salyers, 1998.

EVALUACIÓN SOBRE SEGURIDAD AMBIENTAL

Algodón

El algodón pertenece al género *Gossypium*, de la tribu *Gossypieae*, y de la familia *Malvaceae*. Las especies de algodón importantes desde un punto de vista agronómico en todo el mundo son cuatro: las dos especies Asiáticas diploides, *G. arboreum* y *G. herbaceum*, y las dos especies alotetraploides del Nuevo Mundo, *G. barbadense* y *G. hirsutum*. Pese a que las especies diploides aún son importantes en áreas restringidas de la India, Asia y África, las dos especies del Nuevo Mundo son las responsables del 98% de la producción mundial de fibra de algodón. Las especies salvajes de *Gossypium* surgen típicamente en las zonas áridas tropicales y subtropicales. Especies salvajes de *G. hirsutum* son relativamente inusuales y tienden a estar ampliamente dispersadas.

Potencial de Cruzamiento con otras Especies

El algodón es un cultivo predominantemente auto-polinizado, pero puede ser polinizado de forma cruzada por ciertos insectos. Sin embargo, el cruzamiento del gen *cryIAc* desde el algodón Bollgard hacia otras especies de *Gossypium* o a otros miembros de la familia malvacea es extremadamente improbable por las siguientes razones (Percival et al., 1999):

- El algodón cultivado es un alotetraploide y es incompatible con especies diploides de algodón cultivadas o salvajes; por lo tanto, no se puede cruzar y producir descendencia fértil.
- Pese a que el cruzamiento con especies alotetraploides salvajes *Gossypium* puede ocurrir, la producción comercial de algodón no ocurre generalmente en la misma localización geográfica que los parientes salvajes. Por ejemplo, el cruzamiento externo de *G. tomentosum* en Hawaii es posible, pero en Hawaii no se cultiva algodón comercialmente.
- No hay identificadas en Europa otras plantas distintas al algodón que sean compatibles sexualmente con el algodón cultivado.

Si el gen *cryIAc* llegara a ser transferido a poblaciones salvajes de especies de algodón tetraploides, y si esto fuera considerado indeseable, el tamaño de las plantas, su hábito de crecimiento perenne, su hábitat restringido y su baja fecundidad natural las harían fácilmente controlables. El cruzamiento de la característica de protección contra insectos a otros genotipos de algodón cultivados es posible si las plantas están próximas; sin embargo, diferentes estudios han demostrado que esto ocurre en frecuencias muy bajas y no es considerado como una preocupación, ya que es improbable que cause ningún impacto adverso en el medio ambiente (Green y Jones, 1953; Mehetre, 1992). En ensayos de campo realizados en Andalucía con variedades de algodón modificadas genéticamente para tolerancia al herbicida glifosato, no se ha encontrado polinización cruzada en otras plantas de algodón situadas a una distancia superior a 4 m. (López-Granados y García-Torres, 1999, datos no publicados).

Comportamiento Agronómico

Los datos de ensayos en campo concernientes a rendimientos y observaciones visuales de propiedades agronómicas, incluyendo susceptibilidad a enfermedades e insectos, indican que el algodón Bollgard 531 no es diferente en el comportamiento agronómico comparado con variedades no-modificadas. El algodón Bollgard no posee ningún riesgo como plaga para otras plantas y el medio ambiente, diferente a las variedades convencionales de algodón, como se demuestra por la siguiente información:

Potencial de Transformarse en Mala Hierba

El algodón Bollgard no tiene ninguna característica de mala hierba diferente a las variedades convencionales de algodón. No se considera que el algodón tenga características de maleza, tales como latencia de la semilla, persistencia en el suelo, germinación bajo condiciones ambientales diversas, crecimiento vegetativo rápido, ciclo de vida corto o alta producción y dispersión de semillas. El algodón Bollgard no muestra características agronómicas o morfológicas distintas comparado con los controles, que pudieran conferirle una ventaja competitiva sobre otras especies en el ecosistema en el cual es cultivado. También, existe poca probabilidad de que alguna especie *Gossypium*, que se cruce con el algodón

Bollgard, pueda hacerse más similar a una mala hierba. Todos los parientes salvajes del algodón son arbustos perennes tropicales, leñosos, además de algunos arbustos herbáceos (Percival *et al.*, 1999). En la mayoría de los casos, la distribución de estas especies está determinada por el suelo y las condiciones climáticas. Basándose en estos argumentos y en experiencia en el campo, no hay indicación de que la inserción del gen *cryIAc* dentro del genoma del algodón tenga algún efecto en las características de maleza de la planta de algodón.

Ausencia de Efecto en Organismos No-diana

Existe extensa información sobre preparaciones microbianas de B.t.k. conteniendo proteínas Cry, incluyendo la proteína CryIAc, que demuestran que estas proteínas no son tóxicas para organismos no-diana (U.S. EPA, 1988; Viñuela y del Estal, 1999; Betz *et al.*, 2000). La literatura ha establecido que estas proteínas Cry son extremadamente selectivas para insectos lepidópteros, se unen específicamente a receptores en el intestino

medio de insectos lepidópteros y no tienen efectos adversos en insectos beneficiosos y no-diana. Este perfil toxicológico determina el gran interés en incluir los preparados microbianos y las variedades Bt en el control integrado de plagas (Caballero y Ferré, 2001)



La proteína CryIAc es inofensiva para la mariquita y otros artrópodos auxiliares, enemigos naturales de diversas plagas

Para confirmar y expandir los resultados obtenidos para los productos microbianos que contienen la misma proteína CryIAc que el algodón Bollgard, se evaluó el impacto potencial de la proteína CryIAc en varios organismos representativos no-diana. Las especies de insecto no-diana incluyeron larvas de abeja y abejas adultas (*Apis mellifera L.*), un insecto polinizador beneficioso; larvas de crisopas (*Chrysoperla carnea*), un insecto polinizador beneficioso encontrado comúnmente en algodón y otros cultivos; un himenóptero parásito de moscas domésticas beneficioso (*Nasonia vitripennis*); una mariquita (*Hippodamia convergens*), un insecto predador beneficioso que se alimenta de áfidos y otras plagas de malezas y plantas cultivadas; y colémbolos (*Folsomia candida* y *Xenylla grisea*) organismos del suelo no-diana. No hubo efectos nocivos en el crecimiento y desarrollo de los insectos y organismos examinados (Betz *et al.*, 2000). Tampoco se observaron efectos cuando se alimentó a *Folsomia candida* y *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae) con material de hoja de algodón transgénico que contenía la proteína CryIAc (Yu *et al.*, 1997; Betz *et al.*, 2000).

Los ensayos de campo que se han completado en Andalucía desde 1996 han incluido un seguimiento detallado de las poblaciones de los insectos auxiliares más importantes, de acuerdo con el programa de ATRIAS (Asociaciones para Tratamientos Integrados en Algodón) que se viene implementando en esta región (Durán *et al.*, 1998):

Especies de insectos auxiliares depredadores más frecuentes en los campos con variedades de algodón Bollgard, en Andalucía.

Orius spp.
Nabis spp.
Chrysoperla carnea
Geocoris spp.
Deraeocoris spp.
 Coccinélidos (*Coccinella spp.*, *Hippodamia spp.*, *Scymus spp.*, *Stethorus spp.*)

Los resultados de estas evaluaciones ponen de manifiesto la selectividad de la proteína CryIAc, expresada en el algodón Bollgard, evento 531, sobre estas especies. En las poblaciones recogidas, los depredadores más abundantes eran *Orius spp.*, *Nabis spp.*, *Chrysoperla carnea* y *Geocoris spp.*, registrándose niveles similares para todos ellos en las parcelas que incluían la

protección Bollgard y en aquellas sembradas con algodón convencional, cuando no se aplicaban tratamientos insecticidas (Novillo *et al.*, 1999; Parrado *et al.*, 2001). Por otra parte, la protección Bollgard permitiría un ahorro significativo de productos no selectivos, con resultados medios de 10.7 a 15.8 l/ha, empleados actualmente para proteger las cosechas de algodón, y evitaría los efectos negativos que estos productos causan a estas especies, principales agentes de la lucha biológica en este cultivo.



Mediante ensayos en campo en Andalucía, que incluían variedades de algodón Bollgard (dcha) y sus variedades isogénicas no modificadas (izda), se ha comprobado la eficacia de la protección Bollgard frente a orugas de las cápsulas y su seguridad medioambiental.

También se ha realizado un estudio del potencial impacto sobre aves presentes en campos Bollgard. Se alimentaron codornices con una dieta conteniendo 10% de harina cruda de semilla de algodón de algodón Bollgard y algodón testigo. Este nivel de alimentación de semilla de algodón se aproxima al consumo de 400 semillas/kg de peso corporal por ave. No hubo diferencia en el consumo de alimento o la ganancia de peso para las codornices alimentadas con la dieta en base a semilla de algodón Bollgard versus el alimento con semilla de algodón testigo (Betz *et al.*, 2000).

La proteína CryIAC purificada fue administrada oralmente, mediante cebos, a ratas macho y hembra a 500, 1000 y 4200 mg/kg de peso corporal. El crecimiento y consumo alimenticio de los ratones no fue afectado por la proteína CryIAC (Betz *et al.*, 2000). Los niveles de proteína a los que los ratones fueron expuestos, representan un factor de seguridad de más de 50.000 veces la cantidad que una vaca consumiría cuando se alimenta de semilla de algodón cruda.

Comportamiento en el Medio Ambiente de la proteína CryIAC

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) ha llevado a cabo estudios medioambientales de las proteínas Cry y ha publicado la carencia de impacto significativo (FONSI: findings of no significant impact) para la proteína CryIAC (USDA, 1995).

El comportamiento en el medio ambiente de proteínas Cry purificadas ha sido estudiado extensamente. Se ha comprobado que los cristales de proteína Cry se degradan rápidamente en el campo debido a la radiación solar y a la temperatura (Palm *et al.*, 1993, 1994, 1996). Los estudios publicados han demostrado que la adsorción de la proteína Cry al suelo es rápida y se completa dentro en 30 minutos (Venkateswerlu y Stotzky, 1992). Otros numerosos estudios han analizado la biodegradación y la adherencia de proteínas Cry en el suelo (Tapp *et al.*, 1994; Tapp y Stotzky 1995, 1998; Crecchio y Stotzky, 1998; Koskella y Stotzky, 1997). Estos estudios demuestran que proteínas Cry aisladas pueden unirse a partículas de barro y ácidos del humus en mezclas de suelos artificiales.

Se han medido los niveles de proteína CryIAC en plantas maduras completas, al final de la campaña, obtenidas a partir de ensayos en campo, en 1992 y 1993. Dichos datos se han utilizado para estimar la cantidad de proteína CryIAC que se incorporaría al medio ambiente después de la cosecha, cuando las plantas son aradas e incorporadas al suelo. Para los dos años evaluados (1992 y 1993), la carga en el suelo fue estimada en 3,5 y 1,5 gramos de proteína CryIAC por hectárea, respectivamente. Tomando como base estos datos, se llevó a cabo un estudio de degradación *in vitro* en el suelo, utilizando la actividad insecticida para medir la degradación de la proteína. Este estudio mostró que la proteína CryIAC es rápidamente degradada en el suelo, tanto en la forma purificada o como parte del tejido de la planta de

algodón. Se calculó que la vida media de la proteína CryIAc en el tejido vegetal es 41 días, lo que es comparable a las velocidades de degradación citadas para las formulaciones microbianas *B.t.* (Betz *et al.*, 2000). La vida media para la proteína purificada fue menor de 20 días. Estos valores son similares a las velocidades de degradación observadas por Palm *et al.*, (1993, 1994, 1996) para plantas transgénicas que producen proteínas Cry.

AUTORIZACIONES DE BOLLGARD EN EL MUNDO

Después de completarse las preceptivas evaluaciones de seguridad, el algodón genéticamente protegido contra orugas de las cápsulas, Bollgard, está autorizado en EEUU desde 1995. Los países que desde entonces se han sumado a su autorización son hasta la fecha: México, Australia, Argentina, China, Sudáfrica, Indonesia e India. Estos países representan la gran mayoría del algodón que actualmente se cultiva en el mundo e incluyen diferentes entornos socioeconómicos, desde grandes explotaciones hasta pequeños agricultores, en países como China o Sudáfrica. Como prueba de que los resultados obtenidos han sido positivos, la autorización en EEUU ha sido prorrogada por otros 5 años en 2001.

En la Unión Europea, la autorización para el algodón Bollgard, evento 531, fue solicitada en 1996, habiendo recibido en 1998 el informe positivo del Comité Científico de Plantas de la U.E.: (http://www.europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out18_en.html)

La agencia de seguridad alimentaria del Reino Unido –Food Standards Agency- ha publicado en internet su opinión sobre el aceite derivado del algodón 531 genéticamente protegido contra insectos, de acuerdo con el procedimiento establecido en el Artículo 5 del Reglamento CE 258/97 sobre nuevos alimentos. La conclusión de la Food Standards Agency es que el aceite de la línea 531 es sustancialmente equivalente (en términos de composición, valor nutricional, metabolismo, usos propuestos y niveles de sustancias indeseables) al aceite procedente de líneas convencionales de algodón. Los detalles de la evaluación pueden consultarse en: <http://www.foodstandards.gov.uk/science/ouradvisors/novelfood/assess/substantialequivalencenotific/gmcottonseedoils>

Anteriormente, el Comité Científico Director de la Comisión Europea se había pronunciado sobre el empleo de algodón genéticamente modificado en instrumentos médicos concluyendo que no se identificaban riesgos adicionales en comparación con otras variedades de algodón para el empleo de la fibra en productos de higiene.

CONCLUSIONES

La introducción del algodón Bollgard ha reducido el número y coste de aplicaciones de insecticidas necesarias para el control de la oruga de las cápsulas, entre ellas *H. armigera*, *P. gossypiella* y *E. insulana*, plagas de importancia agrícola en el algodón cultivado en España.

La proteína CryIAc introducida es comparable a las proteínas Cry que han sido utilizadas de forma segura, durante más de 40 años.

Los estudios alimenticios detallados y de seguridad medioambiental confirman la seguridad de este producto. Estos análisis incluyeron: 1) caracterización molecular detallada del ADN introducido; 2) estudios de seguridad de las proteínas expresadas CryIAc y NPTII; 3) análisis de composición de la semilla de algodón, aceite y harina; y 4) estudio del impacto en el medio ambiente de la proteína CryIAc y de las plantas de algodón Bollgard. Estos estudios han demostrado que la proteína CryIAc posee riesgos mínimos para organismos no-diana, incluyendo humanos, animales e insectos beneficiosos.

Basándose en los datos disponibles y en la experiencia acumulada hasta la fecha, el algodón Bollgard posee riesgos comparables o menores para el medio ambiente que el algodón tradicional protegido con insecticidas aprobados comercialmente. En cambio, la reducción de las aplicaciones de insecticidas como resultado del uso de Bollgard proporciona beneficios ambientales significativos. Adicionalmente, se ha comprobado que las plantas de algodón Bollgard, semilla de algodón, aceite de semilla de algodón y fibra son equivalentes y por lo tanto tan seguras como las variedades convencionales de algodón.

REFERENCIAS

- ALVARADO, M., ARANDA, E., DURÁN, J.M., ORTIZ, E., PÁEZ, J.I., ROSA, A DE LA, SERRANO, A. Y VEGA, J.M. 1999. Plagas y enfermedades del Algodón. Dirección General de la Producción Agraria. Divulgación Sanidad Vegetal. Junta de Andalucía.
- ALVARADO, M. Y DURÁN, J.M., 1996: Incidencias climáticas y fitosanitarias en los cultivos españoles durante 1995: Algodón. *Phytoma España*. 77: 18-23.
- ASTWOOD, J.D. AND R.L. FUCHS. 1996. Food allergens are stable to digestion in a simple model of the gastrointestinal tract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 97: 241.
- ASTWOOD, J.D., J.N. LEACH, AND R.L. FUCHS. 1996. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology* 14:1269-1273.
- BAUM, J.A.T.B. JOHNSON, AND B.C. CARLTON. 1999. *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bioinsecticide products. *In Methods in Biotechnology*. Pp 189-209. Vol 5. Biopesticides: Use and Delivery (F.R. Hall and J.J. Mean (eds). Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- BEEVER, D.E., AND C.F. KEMP. 2000. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock feeds and feeding*. 70: 175-182.
- BELYEA, R.L., B.J. STEEVENS, R.J. RESTREPO, AND A.P. CLUBB. 1989. Variation in composition of by-product feeds. *J. Dairy Sci.* 72:2339-2345.
- BERARDI, L.C. AND L.A. GOLDBLATT. 1980. Gossypol. Pp. 184-237. *In: Toxic Constituents of Foodstuffs*. 2nd Ed. Liener, I.E. (ed.), Academic Press, New York.
- BERBERICH, S.A., J.E. REAM, T.L. JACKSON, R. WOOD, R. STIPANOVIC, P. HARVEY, S. PATZER, AND R.L. FUCHS. 1996. The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional Cottonseed. *J. Agri. Food Chem.* 44:365-371.
- BETZ, F.S., B.G. HAMMOND AND R.L. FUCHS. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32:156-173.
- BROER, I., W. DROGE-LASER, AND M. GERKE. 1996. Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to agrobacteria. Pp 67-70. *In* E.R. Schmidt, T. Hankeln (eds.). *Transgenic organisms and biosafety*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- BUSH, R.K., S.L. TAYLOR, J.A. NORDLEE, AND W.W. BUSSE. 1985. Soybean oil is not allergenic to soybean-sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76(2): 242-245.
- CARPENTER, J.E. AND L.P. GIANESSI. 2001. Agricultural biotechnology: updated benefit estimates. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington, D.C.
- CASTILLO, A.R., M.R. GALLARDO, M. MACIEL, J.M. GIORDANO, G.A. CONTI, M.C. GAGGIOTTI, O. QUAINO, C. GIANNI, AND G.F. HARTNELL. 2001. Effect of feeding dairy cows with either Bollgard BollgardII, Roundup Ready or control cottonseeds on feed intake, milk yield and milk composition. *J. Dairy Sci.*, Vol 84, suppl. 1, Abstract 1712.
- CERRY, J. P. 1983. Cottonseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60(2):360-367.

- CHERRY, J.P. AND H.R. LEFFLER. 1984. Chapter 13: Seed. Pp 511-569. *In* Cotton; Kohel, R.J., and C.F. Lewis, (eds.) No. 24 in AGRONOMY Series; American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Publishers: Madison, WI.
- CHERRY, J.P., J.G. SIMMONS, AND R.J. KOHEL. 1978a. Potential for improving cottonseed quality by genetic and agronomic practices. Pp 343-364. *In* Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins; Friedman, M. (ed.), Plenum Press: New York.
- CHERRY, J.P., J.G. SIMMONS, AND R.J. KOHEL. 1978b. Cottonseed composition of national variety test cultivars grown at different Texas locations. Pp 47-50. *In* Proceedings of the Beltwide Cotton Production Research Conference, Dallas, TX, (J.M. Brown, (ed.) National Cotton Council: Memphis, TN.
- COTTONSEED OIL. 1993. L.A. Jones and C.C. King (eds.), National Cottonseed Products Associations, Inc. and the Cotton Foundation, Memphis, TN.
- CRECCHIO, C. AND .G. STOTZKY. 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. Soil Bio. Biochem., 30:463-470.
- DAVISON, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid 42, 73-91.
- DICKS, M.W. 1965. Vitamin E content of foods and feeds for human and animal consumption. Univ. Wyoming Agricultural Experiment Station. Bulletin 435.
- DOOLITTLE, R.F., D.F. FENG, K.L. ANDERSON, AND M.R. ALBERRO. 1990. A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. J. Molecular Evolution 31:383-388.
- DURÁN, J. M., ALVARADO, M., SERRANO, A., DE LA ROSA, A. Y ORTIZ, E. 1998 Chinchas auxiliares del algodón en Andalucía Occidental. Bol. San. Veg. Plagas, 24: 113-126.
- ECONOMIC RESEARCH SERVICE/USDA. 2000. Genetically engineered crops: has adoption reduced pesticide use? Pp13-17. *Agricultural Outlook*, August 2000.
- EDGE, J.M., J.H. BENEDICT, J.P. CARROLL, AND H.K. REDING. 2001. Bollgard Cotton: An assessment of global economic, environmental, and social benefits. J. Cotton Science 5:1-8.
- ENGLISH, L. AND S.L. SLATIN. 1992. Mode of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. Insect Biochem. Molec. Biol., 22(1):1-7.
- FALCK-ZEPEDA J.B., G. TRAXLER, AND R.G. NELSON. 1998. Rent creation and distribution from biotechnology innovations: the case of Bt cotton and herbicide-tolerant soybeans in 1997. *Agribusiness* 16:1-25. ISAAA Briefs No. 14 ISAAA, Ithaca, NY.
- FALCK-ZEPEDA J.B., G. TRAXLER, AND R.G. NELSON. 2000. Surplus distribution from the introduction of a biotechnology innovation. Am J of Agric Economics 82:360-369.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 1995. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies, Rome, Italy, November 13-14, 1995. FAO, Rome.
- FERNANDEZ-CORNEJO J, AND W.D. MCBRIDE. 2000. Genetically engineered crops for pest management in U.S. agriculture: farm level effects. Economic Research Service/U.S. Department of Agriculture-Agricultural Economic Report (AER)-786.
- FUCHS, R.L. AND J.D. ASTWOOD. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. Food Technology 50: 83-88.
- FUCHS, R.L., J.E. REAM, B.G. HAMMOND, M.W. NAYLOR, R.M. LEIMGRUBER AND S.A. BERBERICH. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. Bio/Technology 11:1543-1547.
- GIANESSI, L.P. AND J.E. CARPENTER. 1999. Agricultural Biotechnology: Insect Control Benefits. National Center for Food and Agricultural Policy. <http://www.bio.org/food&ag/ncfap.htm>
- GIANESSI, L.P., SILVERS, C.S., SANKULA, S. AND CARPENTER, J.E. 2002. Plant Biotechnology: Current and Potential for Improving Pest Management in U.S. Ag. An Analysis of 40 Case Studies. National Center for Food & Agricultural Policy, Washington, D.C. <http://www.ncfap.org/40CaseStudies.htm>
- GREEN, J.M. AND M.D. JONES. 1953. Isolation of cotton for seed increase. Agron. J. 45:366-368.
- HALSEY, A.B., M.E. MARTIN, M.E. RUFF, F.O. JACOBS AND R.L. JACOBS. 1986. Sunflower oil is not allergenic to sunflower seed-sensitive patients. J. Allergy Clin. Immunol 78(3):408-410.
- HOFMANN, C., P. LÜTHY, R. HUTTER, AND V. PLISKA. 1988. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur. J. Biochem. 173: 85-91.
- ISAAA, 2002. Benefits of Bt cotton in China, India, Indonesia, México and South Africa. <http://www.isaaa.org>
- KÄRENLAMP, S. 1996. Health effects of marker genes in genetically engineered food plants. *TemaNord* 530.
- KIMBER, I., N.I. KERKVIET, S.L. TAYLOR, J.D. ASTWOOD, K. SARLO, AND R.J. DEARMAN. 1999. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. Toxicological Sciences 48:157-162.
- KLOTZ-INGRAM, C., S. JANS, J. FERNANDEZ-CORNEJO AND W. MCBRIDE. 1999. Farm-level production effects related to the adoption of genetically modified cotton for pest management. AgBioForum 2(2):73-84.
- KOHEL, R.J., J. GLUECK, AND L.W. ROONEY. 1985. Comparison of cotton germplasm collections for seed-protein content. Crop Sci. 25:961-963.
- KOSKELLA, J. AND G. STOTZKY. 1997. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. Appl. Environ. Microbiol. 63(9):3561-3568.
- LAWHON, J.T., C. M. CATER, AND K.F. MATTIL. 1977. Evaluation of the food use potential of sixteen varieties of cottonseed. J. Amer. Oil Chem. Soc. 54:75-80
- LEONARD P. GIANESSI, CRESSIDA S. SILVERS, SUJATHA SANKULA AND JANET E. CARPENTER. 2002. Plant Biotechnology: Current and Potential Impact For Improving Pest Management In U.S. Agriculture: An Analysis of 40 Case Studies. National Center for Food and Agricultural Policy. <http://www.ncfap.org/40CaseStudies.htm>

- LÜTHY, P., J.L. CORDIER, AND H.M. FISCHER. 1982. "Bacillus thuringiensis as a bacterial insecticide: basic considerations and applications", Pp 35-74. In *Microbial and Viral Pesticides*. E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- MCCCLINTOCK, J.T., C.R. SCHAFFER AND R.D. SJOBLAD. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45:95-105.
- MEHETRE, S.S. 1992. Natural crossing in cotton (*Gossypium Sp.*): Its significance in maintaining variety purity and production of hybrid seed using male sterile lines. *J. Cotton Res. & Dev.* 6(2):73-97.
- METCALFE, D.D., J.D. ASTWOOD, R. TOWNSEND, H.A. SAMPSON, S.L. TAYLOR, AND R.L. FUCHS. 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.
- MONTESINOS, E Y BADOSA, E., 2002. La seguridad de los marcadores de resistencia a antibióticos. *Agricultura*, 836:118-121.
- MORRISON, M. 1996. Do ruminal bacteria exchange genetic material? *J. Dairy Sci.* 79, 1476-1486.
- NATIONAL COTTONSEED PRODUCTS ASSOCIATION. 1989. Cottonseed and Its Products, 9th ed. Memphis TN.
- NIELSEN, K.M., A.M. BONES, K. SMALLA, AND J.D. VAN ELSAS. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - A rare event? *FEMS Microbiology Reviews* 22:79 - 103.
- NIELSEN, K.M., F. GEBHARD, K. SMALLA, A.M. BONES, AND J.D. VAN ELSAS. 1997. Evaluation Of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* Bd413. *Theoretical and Applied Genetics* 95(5/6):815 - 821.
- NOVILLO, C., SOTO, J. Y COSTA, J. 1999. Resultados en España con variedades de algodón, protegidas genéticamente contra las orugas de las cápsulas. *Bol. San. Veg. Plagas* 25:383-393
- PALM, C.J., D.L. SCHALLER, K.K. DONEGAN, AND R.J. SEIDLER. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. *Can. J. Microbiol.* 42:1258-1262.
- PALM, C.J., K.K. DONEGAN, D. HARRIS, AND R.J. SEIDLER. 1994. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Mol. Ecol.* 3:145-151.
- PALM, C.J., R.J. SEIDLER, K.K. DONEGAN, AND D. HARRIS. 1993. Transgenic plant pesticides: Fate and Persistence in soil. *Plant Physiol. Suppl.* 102, 166.
- PARRADO, I., NOVILLO, C., SOTO Y VARGAS-OSUNA E. 2001. Resultados de ensayos de campo con variedades de algodón, mejoradas genéticamente para protección contra las orugas de las cápsulas, en Andalucía. II Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Pamplona 12 a 16 noviembre.
- PERCIVAL, A. E., J.F. WENDEL, AND J.M. STEWART. 1999. Taxonomy and Germplasm Resources. In *Cotton: Origin, History, Technology, and Production*. Pp 33-63. Smith, W.C. (ed.). John Wiley and Sons, Inc. chapter 1.2.
- PRAY, C., MA, D., HUANG, J. AND QUIAO, F. 2001. Impact of Bt cotton in China. *World Development* 29:813-825
- PRIMITIVO CABALLERO Y JUAN FERRÉ. 2001. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. 318 pp. Phytoma-España.
- PRINS, T.W. AND J.C. ZADOKS. 1994. Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a Literature review. *Euphytica* 76:133-138.
- ROSSELL, J.B. 1991. Vegetable oils and fats. Pp 261-327. In *Analysis of Oilseeds, fats, and fatty foods*. Rossell, J.B., and J.L.R. Pritchard (eds.). Elsevier Applied Science Publisher, Ltd.; New York.
- SALYERS, A. 1998. Genetically engineered foods: safety issues associated with antibiotic resistance genes. 'http://www.healthsci.tufts.edu/apua/salyersreport.htm'
- SCHL, TER, K., J. FÜTTERER, AND I. POTRYKUS. 1995. "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if at all - at an extremely low frequency. *Bio/Technology* 13:1094-1098.
- SHAW, K. J., P.N. RATHER, R.S. HARE, AND G.H. MILLER. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:138-163.
- SIMS, S.R., S.A. BERBERICH, D.L. NIDA, L.L. SEGALINI, J.N. LEACH, C.C. EBERT, AND R.L. FUCHS. 1996. Analysis of expressed proteins in fiber fractions from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. *Crop Sci.* 36(5):1212-1216.
- SJOBLAD, R.D., J.T. MCCCLINTOCK AND R. ENGLER. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 15:3-9.
- SMALLA, K., S. BORIN, H. HEUER, F. GEBHARD, J.D. VAN ELSAS, AND K. NIELSEN. 2000. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria. In *Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of GMOs*. Pp 146-154. Fairbairn, C, G. Scoles, and A. McHughen (eds.). University Extension Press, University of Saskatchewan; Saskatoon, Saskatchewan.
- TAPP, H., AND G. STOTZKY. 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1786-1790.
- TAPP, H., AND G. STOTZKY. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 30:471-476.
- TAPP, H., L. CALAMAI, L. AND G. STOTZKY. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biol Biochem.* 26:663-679.
- TATTRE, N.H., AND M. YAGUCHI. 1973. Protein -content of various processed edible oils. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 6(4):289-290.
- TAYLOR, S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technology* 46: 146-152.
- TAYLOR, S.L., R.F. LEMANSKE JR., R.K. BUSH, AND W.W. BUSSE. 1987. Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann. Allergy* 59(5):93-99.

- TAYLOR, S.L., W.W. BUSSE, M.I. SACHS, J.L. PARKER, AND J.W. YUNGINGER. 1981. Peanut oil is not allergenic to peanut-sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68(5):372-375.
- THOMSON, J. 2000. Gene transfer: Mechanisms and Food Safety Risks. Topic 11. Biotech 00/13. Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. 29 May-2 June, 2000. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- TRAXLER G., AND J. FALCK-ZEPEDA. 1999. The distribution of benefits from the introduction of transgenic cotton varieties. *AgBioForum* 2(2):94-98.
- TURNER, J.H., H.H. RAMEY JR. AND S. WORLEY JR.. 1976. Influence of environment on seed quality of four cotton cultivars. *Crop Sci.* 16:407-409.
- U.S. EPA. 1988. Guidance for the re-registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. NTIS PB 89-164198.
- U.S. EPA. 1994. Neomycin phosphotransferase II; tolerance exemption. Federal Register 59(187):49351-49353.
- U.S. EPA. 1998. R.E.D. Facts: *Bacillus thuringiensis*. EPA 738-F-98-001.
- U.S. FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Federal Register 57(104):22984-23005.
- U.S. FDA. 1994. "Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption; Food Additives Permitted in Feed and Drinking Water of Animals; Aminoglycoside 3' Phosphotransferase II" Federal Register 59(98):26700-26711.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. 1995. Volume 23. United State Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD.
- USDA. 1995. Availability of Determination of Non-regulated status for genetically engineered cotton. Federal Register 60(134):36096-36097.
- VENKATESWERLU, G. AND G. STOTZKY. 1992. Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiol.* 25:225-233.
- WHO. 2000. Environmental Health Criteria, 217: *Bacillus thuringiensis*. Geneva. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety (IPCS). http://www.who.int/pcs/docs/ehc_217.html
- VIÑUELA, E. Y DEL ESTAL, P. 1999. Efectos secundarios de los plaguicidas en enemigos naturales de algodón y maíz en España. Revisión Bibliográfica 11 pp. Datos no publicados.
- WIER, A.T., J.W. MULLINS, AND J.M. MILLS. 1998. Bollgard Cotton - Update and economic comparisons including new varieties. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference 2: 1039-1040. National Cotton Council.* Memphis, TN.
- WILSON, F.D., H.M. FLINT, W.R. DEATON, AND R.E. BUEHLER. 1994. Yield, yield components, and fiber properties of insect-resistant cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin gene. *Crop. Sci.* 34:38-41.
- XIA, J.Y., J.J. CUI, L.H. MA, S.L. DONG AND X.F. CUI. 1999. The role of transgenic *Bt* Cotton in integrated insect pest management *Acta Gossypii Sin.* 11:57-64.
- YU, L., R.E. BERRY AND B.A. CROFT. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatidae). *J. Econ. Entomol.* 90(1):113-118.