

Sr Consejero de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León

Rafael Álvarez Martín, con DNI nº XXXXXXXXX y con domicilio en Valladolid, XXXXXXXXXX, en representación de la Comisión de Agroecología y Transgénicos de la asociación **Ecologistas en Acción de Valladolid**, inscrita en el correspondiente Registro de la Junta de Castilla y León.

### **EXPONE**

1º.- Que en el BOCyL de 20 de noviembre de 2007 se publicó el anuncio de información pública relativa a la solicitud de liberación voluntaria de organismos modificados genéticamente con fines distintos a los de su comercialización, del proyecto de ejecución "Programa de experimentación trianual (2006-2008) para caracterización agronómica y otros requisitos para el desarrollo de variedades de remolacha, derivadas de la línea H7-1 modificada genéticamente para expresar tolerancia a glifosato" en los términos municipales de Valdefuentes del Páramo y San Cristóbal de la Polantera (León), Tordesillas (Valladolid) y Pampliega, Villaquirán, Melgar de Fenamental y Miranda de Ebro (Burgos) . Expte.: B/ES/08/01

2º.- Que presentamos alegaciones contra dicho expediente de liberaciones de organismos genéticamente modificados dentro del plazo correspondiente, sin que hayamos recibido comunicación referente al estado de dicho expediente.

3º.- Que con posterioridad a la fecha de presentación de alegaciones se han producido nuevos sucesos, además de haber tenido acceso a nueva documentación de recientes investigaciones que confirman no solo la toxicidad del Roundup, sino también la ineficacia y obsolescencia de los herbicidas basados en el glifosato, y la dinámica que desencadena su uso en la creación de malezas transgénicas adventicias resistentes.

### **SOLICITA:**

1º.- Que le sea dado acceso a dicho expediente : Expte.: B/ES/08/01 . Referido a la situación actual el expediente íntegro, incluyendo por tanto las alegaciones presentadas, los informes recabados por la Administración, y, en su caso, las motivaciones razonadas para la desestimación de las alegaciones.

2º.- Que, ante las nuevas circunstancias, se acompañen los anexos adjuntos al Expte B/ES/08/01.

3º.- Que se declare a la Autonomía de Castilla y León como Región Libre de Transgénicos, ejerciendo o instando ante la Unión Europea el ejercicio de las cláusulas de salvaguardia para esta Región cuyas aptitudes para la producción alimentaria de gran calidad resultan gravemente comprometidas por tales cultivos.

Valladolid, 28 de enero de 2008

Firmado: Rafael Álvarez Martín

A la Dirección General de Prevención Ambiental y Ordenación del Territorio

## Anexo a las alegaciones.

Rafael Álvarez Martín, con DNI nº XXXXXXXXX y con domicilio en Valladolid, XXXXXXXXXXXXX, en representación de la Comisión de Agroecología y Transgénicos de la asociación **Ecologistas en Acción de Valladolid**, inscrita en el correspondiente Registro de la Junta de Castilla y León, en relación con las alegaciones presentada el pasado 28 de Diciembre contra el expediente de liberación de organismos modificados genéticamente Expte: B/ES/08/01 y como ampliación de las mismas.

### Expone:

1º).- Desde el año 2000 venimos haciendo el seguimiento de las liberaciones de cultivos-MG que son autorizadas sistemáticamente por los organismos correspondientes con total aquiescencia. Igualmente se han presentado alegaciones fundamentadas contra las liberaciones que también son desoídas, sin recibir contestación justificativa de los fundamentos técnicos en que se basa la aprobación de las solicitudes de liberación y el rechazo de las alegaciones suficientemente fundamentadas. (realmente las Corporaciones presentan meras Notificaciones y no Solicitudes, ya que son aprobadas automática y acríticamente) .

2º).- Las actuaciones de los diversos órganos de las administraciones implicados en los expedientes de aprobación (a los diversos niveles Estatal, autonómico o provincial, y desde las diversas Consejerías (Sanidad, Medio Ambiente, Agricultura) son deplorables e imprudentes, no teniendo parangón entre los Estados miembros de la Unión Europea. No se limitan a la inaplicación del Principio de Precaución” ante efectos desconocidos, sino que además ignoran o desprecian los peligros y daños que ya son bien conocidos.

No pudiendo afirmar que se trate de una situación de **generalizada sumisión y connivencia con las Corporaciones biotecnológicas**, lo que implicaría imputar un grave delito de prevaricación, debemos suponer que la inactividad y aquiescencia se deben a las carencias de conocimientos científicos actualizados de los Organismos implicados; en consecuencia, adjuntamos nueva información y referencias bibliográficas al respecto.

3º).- Las nuevas comunicaciones científicas accesibles durante estos últimos días, así como informaciones y comentarios realizados recientemente por las Corporaciones Biotecnológicas, obliga a matizar algunos aspectos de nuestras medidas e insuficientes alegaciones:

**A.- El Principio de Precaución.** No es un obstáculo para el avance científico, sino para evitar catástrofes tecnológicas. Nada se opone a la investigación biológica o a la producción de vacunas manejando gérmenes que pueden provocar pandemias siempre que se realicen en los contenedores adecuados para la magnitud del riesgo (laboratorio despresurizado, descontaminación de materiales y personas salientes, destrucción eficaz de los residuos, etc) . Lo inadmisibles es la difusión en el ambiente, incluso en forma masiva, de elementos que con toda seguridad están causando graves daños, que potencialmente pueden alterar el universo bacteriano hasta producir una Biosfera incompatible con la supervivencia de los seres vivos superiores; que es imposible recoger una vez disperso en el aire, el agua, los suelos y las bacterias y demás seres vivos; y cuyos efectos no decaen con el tiempo (como los 20 0 30 años necesarios para la degradación de organoclorados y otros tóxicos o disruptores) sino que se regeneran reproducen y multiplican a ritmo exponencial.

**B. – Efectos sobre la salud y el Medio Ambiente.** No solo no está acreditada la inocuidad de los alimentos y cultivos transgénicos para la salud y el ambiente como decíamos ( lo que ya sería suficiente para impedir las liberaciones según el principio de precaución) sino que ya están suficientemente acreditados los daños para la salud de los cultivos transgénicos plaguicidas o resistentes a los herbicidas (como es el caso de la remolacha); así como los daños causados por el Roundup, cuya aplicación es inseparable del cultivo transgénico, puesto que la resistencia al mismo es el objetivo de la transformación. A los efectos directos tóxicos, de alergenidad, disrupción endocrina, simulador hormonal, etc; se suman los derivados de la modificación de los microorganismos patógenos por transferencia horizontal de genes y plásmidos virulentos contenidos en la casete transformadora que se expresa en la totalidad de la planta de remolacha transgénica (hojas, flores, raíces y sus exudados), lo que pueden hacerlos indestructibles o no reconocibles por el sistema inmunológico humano. Esto se agrava porque además se está difundiendo la resistencia múltiple de los patógenos a los antibióticos.

**C. - Supermalezas resistentes a los herbicidas.** No solo hay un peligro potencial de que se formen (como ya advirtieron hace años Altieri y otros), sino que se están produciendo infestaciones masivas en todo el mundo debido a las supermalezas creadas o estimuladas por el glifosato:

\* hay diversas especies de adventicias que tienen cierta resistencia natural al glifosato, proliferando en los cultivos y en el medio silvestre debido a su prevalencia competitiva sobre las adventicias sensibles.

\* la progenie de estas plantas naturalmente resistentes, después de haber sido tratadas inútilmente con el glifosato, adquiere mucha mayor resistencia al glifosato de la que tenía inicialmente. Las proteínas transportadoras actúan en los diversos sistemas (animales, bacterianos, fúngicos, vegetales) , sugiriendo que se produce mutación que provoca la disrupción en el transporte del herbicida.

\* Además, se produce resistencia cruzada, no solo al glifosato sino a otros herbicidas aunque tengan distinta composición química y mecanismo de actuación, lo que obliga a usar dosis crecientes de aquel, combinado con la aplicación de otros herbicidas aún más agresivos y tóxicos. (Ambudkar 2006, Piddack 2006).

En consecuencia, la aplicación del Roundup, además de los daños causados a la salud y al ambiente, ocasiona a corto plazo un incremento en el consumo de herbicidas, como ya ha ocurrido en todos los sitios en que el uso del Roundup lleva algún tiempo, tanto en EE UU como en Argentina, en la que el incremento del consumo de plaguicidas se ha multiplicado desde la utilización del Roundup.

La magnitud del problema de la difusión por todo el mundo de las supermalezas resistentes ha sido ocultada en los medios de comunicación, o bien publicada referido como un caso puntual y no como el problema global que es para toda la Biosfera.

Ya se han descrito más de 200 malezas muy agresivas que se han convertido en resistentes al glifosato. En esta liberación concreta hay que recordar que la remolacha transgénica tiene gran capacidad de dispersión y germinación, estimándose que cada planta florecida origina 18 plantas de remolacha transgénica adventicia esparcidas a distancias que pueden ser de varios kilómetros, ya sea entre la flora silvestre o como supermaleza de los cultivos naturales de remolacha o de cualquier tipo de cultivo.

En 2007 se difundieron por GRAIN estudios sobre “El uso de herbicidas en los cultivos transgénicos” en que se denuncia como las Corporaciones biotecnológicas (Monsanto, BASF, Dow...) compiten, y al mismo tiempo colaboran, en la investigación y desarrollo de nuevos cultivos transgénicos resistentes a los nuevos herbicidas más tóxicos que ya se están utilizando ante el fracaso creciente del glifosato debido a la difusión masiva de las malezas que se han vuelto resistentes. Esas Corporaciones negaban hace unos años (incluso siguen negándolo en Notificaciones recientes, como siguen negando los efectos tóxicos y disruptores del Roundup) que se produjeran supermalezas resistentes al glifosato. Se trata de obtener el monopolio mundial sobre las semillas y la alimentación ( o sea el poder de administrar el hambre y las enfermedades degenerativas en el mundo).

Entre los herbicidas que ya se están utilizando en algunos casos, está el 2,4-D , el agente naranja usado en la deforestación de Vietnam y cuyas consecuencias persisten hoy día. El desarrollo de nuevos transgénicos resistentes al 2,4-D ( previsto para dentro de dos años) y otros herbicidas muy tóxicos significa el uso masivo y generalizado de esos tóxicos.

La estrategia de las Corporaciones ha sido, como denunció hace años The Guardian, dispersar la contaminación genética por todas partes y tan rápidamente que no quede referencias de cultivos y semillas naturales sin contaminar . Efectivamente lo han conseguido gracias a la complicidad de las Autoridades políticas, de muchos científicos y de algunos Tribunales en todo el mundo; o bien mediante la introducción fraudulenta de semillas transgénicas disfrazadas como donaciones de “ayuda humanitaria” durante las hambrunas que afectaron, y siguen afectando gran parte del planeta.

En conclusión: los cultivos transgénicos han provocado la contaminación genética irreversible del planeta para volver al punto de partida de la “revolución verde” denunciada hace medio siglo, y bien documentada ya en “ La primavera silenciosa” de Rachel Carson. Pero hay una diferencia fundamental: Se recurre nuevamente a los agro-tóxicos más dañinos para tener peores resultados, puesto que se han generalizado las **resistencias cruzadas** en las plagas y malezas hacia los agro-tóxicos utilizados y a los que se puedan desarrollar, por lo que su efectividad será cada mas efímera. Estamos ante la bien descrita y comprobada “noria de los plaguicidas”.

**D.- Destrucción de los residuos y contaminación genética.** Ya hemos advertido que la llamada “destrucción” no destruye absolutamente nada en lo que se refiere a la contaminación genética originada por el cultivo y los residuos de la cosecha. Decíamos en la alegación 4ª sobre los riesgos de los residuos que sería necesaria su incineración, (lo que impide su uso para alimentación del ganado o para su compostaje). Sin embargo, esto seguiría siendo insuficiente para evitar la contaminación genética, conforme a conocimientos ya consolidados e incuestionables (la transferencia de los transgenes y parásitos genéticos insertados, hasta las bacterias de suelo, agua, atmósfera y el conjunto de la biosfera) puesto que el suelo agrícola ya está contaminado. Ni siquiera sería suficiente la remoción y tratamiento de la tierra laborable, como en el caso de la contaminación radiactiva, debido a que no existe una determinación eficaz y rápida de la contaminación genética,(que sí existe para la radioactividad), a la movilidad de las bacterias, microorganismos y entomofauna portadora o transmisora de la contaminación, y a la facultad de reproducirse y multiplicarse.

#### **E.- Durante este mes de enero de 2008 se han producido dos sucesos significativos:**

- Francia se acoge a la cláusula de salvaguardia para prohibir el cultivo de un maíz peligroso para la salud y el

medio ambiente del que España es el principal y casi único cultivador europeo.

- Aparece en España el manifiesto "Democracia, precaución y medio ambiente" suscrito por investigadores y otros miembros de la Sociedad Civil.

**F.- Agrocombustibles y agroplásticos** . El problema de los cultivos-MG alcanza actualmente horizontes dramáticos ante la promoción de cultivos para combustibles y de árboles-MG, apoyándose en la gran falacia de su inocuidad al no tener destino alimentario. Además, ante la escasez del petróleo que ha sido base de toda la síntesis orgánica, se pretenden generalizar cultivos-MG adecuados para la fabricación de polímeros plásticos. Los árboles-MG son aun más peligrosos (el polen transgénico se puede dispersar a centenares de kilómetros, y la tecnología "terminator" destinada a evitarlo causaría indefectiblemente la extensión de la esterilidad al medio silvestre) . La cantidad de tierras de cultivo necesarias para sustituir al petróleo en la proporción que se pretende, y para la producción de plásticos sería superior a la tierra laborable que se destina actualmente para la producción de alimentos. Estos nuevos cultivos transgénicos ya se están plantando en muchos sitios, y existe un aluvión de otros en experimentación. Esto lo realizan con absoluta desvergüenza las mismas Corporaciones que, como Monsanto, manifestaban que los alimentos y cultivos transgénicos que desarrollaban eran para solucionar el hambre en una población mundial creciente.

Anexos que se acompañan:

Anexo I.- Conocimientos sobre Genómica y los cultivos-MG en 1999.

Anexo II.- Conocimientos sobre Genómica y experiencia sobre los cultivos-MG desde el año 2000 hasta ahora.

Anexo III.- Extracto de algunas de las alegaciones expuestas en años anteriores contra la liberación ambiental de organismos genéticamente modificados, y algunas de las referencias científicas que se aportaron.

En el "Anexo I" se trata de recordar la situación del conocimiento genómico ya existente hace una década (durante la que se han producido los mayores avances en la Genómica Estructural y Genómica Funcional ). Permite correlacionar los conocimientos científicos que ya entonces estaban consolidados, con los errores, asertos injustificado, y creencias científicas ya desechadas contenidas en las Notificaciones presentadas entonces por Corporaciones; y la falsedad, ya entonces evidenciada, de los "Dogmas Fundamentales de la Biotecnología" con los que se pretendía justificar las liberaciones sin observar el Principio de Precaución.

También se trata de comprobar que los conceptos genómicos expuestos por los genetistas críticos, (cuyas referencias fueros aportadas en las alegaciones presentadas en años anteriores ) eran coincidentes con los resultados de las investigaciones y de los nuevos conocimientos adquiridos durante esta década.

## Anexo I. Conocimientos sobre Genómica y los cultivos-MG en 1999.

**1º).- Los referidos en “Ingeniería genética, ¿sueño o pesadilla? de por Mae Wan Ho , y en toda la amplísima bibliografía que avala científicamente los asertos del libro.**

Todos los asertos científicos expuestos en el libro y en su amplia bibliografía deberían haber sido considerados por las administraciones y técnicos españoles, estando fundamentados con suficiente rigor y solidez, (En contraste, con los argumentos de las Corporaciones notificadoras que se limitaban a meros asertos, carentes de justificación científica o contrarios a evidencias ya comprobadas) .

El rigor científico que fue contrastado por sucesivas investigaciones y tuvo que ser admitido sucesivamente por la Ciencia Oficial ( la importancia del “ADN basura”, el concepto de “genoma fluido disperso e interactivo”, la inestabilidad intrínseca de los organismos transgénicos, y los “hot spot” , la falsedad o insuficiencia de los “dogmas de la biotecnología y de la supuesta “equivalencia sustancial”, las mutaciones o delecciones en el entorno del punto de inserción, en lugares muy alejados, y en la expresión global de los genes .....).

Es significativo que todo los asertos que expone la genetista Mae Wan Ho y su concepción del funcionamiento del genoma, que contradice frontalmente los que se venían considerando Dogmas de la biotecnología, se han ido confirmando hasta el día de hoy. Esto indica que no había dos opiniones científicas respecto al genoma, sino un concepto verdadero (genoma fluido, disperso e interactivo) que era el que forzosamente se tenía que deducir de los conocimientos consolidados que ya existían en 1998, y otro concepto que simplificaba la inabarcable complejidad biológica a un esquema mecánico, irreal necesario para justificar las aplicaciones de la tecnología aberrante (el ADN recombinante de “cortar y pegar”) de los cultivos transgénicos. Una falsedad deliberada y a sabiendas que constituye **el mayor fraude científico en la historia humana que se ha puesto en práctica masivamente.**

**2º).- Las observaciones del biólogo, virólogo y genetista alemán Dr. Stefan Lanka, ( Barcelona, 17-6-1998) :**

- El cuerpo humano consta de cien billones de células en cada una de las cuáles están en marcha en cada instante diez mil reacciones bioquímicas que se influyen las unas a las otras,
  - la mayoría de este millón de billones de reacciones que se están realizando en nuestro cuerpo en cada momento son aceleradas por enzimas y otros tipos de proteínas,
  - la información genética para que se forme alguna de las proteínas más sencillas (como la b-globulina) está codificada en varios trozos (exones) del material genético (ADN) de un mismo cromosoma que están separados por trozos de ADN que no contienen información genética conocida (intrones) intercalados.
- para muchas proteínas, la información genética proviene de exones situados en cromosomas distintos,
- los exones necesarios para la formación de una proteína se ponen uno a continuación de otro formando el pre-ARN , el paso de este pre-ARN a ARN-mensajero exige la eliminación de los intrones.
- el ARN-mensajero sale del núcleo para ser captado y leído por unos ‘aparatos’ llamados ribosomas que van sucesivamente leyendo cada tres letras genéticas y las traducen en la adición de un aminoácido determinado constituyendo así bloque a bloque las cadenas de aminoácidos llamadas proteínas,

Este proceso es aún más complejo puesto que:

- a) el lenguaje genético no tiene una lectura universal bajo las diversas circunstancias, la lectura que el ribosoma hace del mismo ARN-mensajero depende de las condiciones que rodean a la célula, por lo que la misma información genética puede dar lugar a proteínas distintas;
- b) la célula puede producir proteínas para las que no existe información en los cromosomas;
- c) orgánulos celulares tienen restos de información genética de efecto no conocido;
- d) la información genética interacciona con el medio ambiente tanto de la célula como del cuerpo;
- e) ni con los ordenadores más potentes se puede predecir la evolución de una ecuación de tres variables que estén relacionadas con el resultado de la ecuación; no digamos si intervienen centenares o incluso millares de variables interdependientes, como ocurre en cada célula, que sólo la propia vida es capaz de regular;...etc.

**La realidad del cromosoma:**

- A).- Es una molécula de ADN larguísima que contiene tres mil millones de pares de letras genéticas;
- B).- Es tan larga que, para no romperse, tiene que autoenroscarse en torno a unas proteínas de sostén llamadas histonas;
- C).- Para poder secuenciar trozos de un cromosoma inevitablemente hay que romper por numerosos lugares cada cromosoma;
- D).- Los dos hilos de cada cromosoma (el proveniente de la madre y el proveniente del padre) están intercambiando permanentemente información entre sí;

- E).- Las distintas partes de un mismo cromosoma también están intercambiando constantemente información entre sí;
  - F).- Distintos cromosomas están intercambiando permanentemente información entre sí;
  - G).- El núcleo tiene la tendencia a asimilar hacia su interior, e incluso incorporar a sus cromosomas, el material genético que se encuentra en el exterior, incluido el contenido en los alimentos.
  - H).- El citoplasma contiene una gran cantidad de ARN que no proviene de ADN alguno;
  - I).- El ARN tiene capacidad de replicarse a sí mismo y además de traducirse en ADN (autoretrotrans-cripción), siendo a menudo estos trozos de nuevo ADN, formados por transcripción inversa de trozos de ARN, usados en procesos de reparación del ADN nuclear;
  - J).- Cada una de los cientos de mitocondrias que tiene cada célula es una bacteria simbiótica que, además de ser el pulmón celular productor de la energía imprescindible (flujo de energía decisivo para la vida), tiene su propio ADN del que depende un millar de productos que son enviados al núcleo celular e intervienen decisivamente en la programación de la información genética nuclear. En realidad, no tiene sentido alguno hablar del 'gen responsable de', y menos de cómo mejorarlo o repararlo.
- Es impredecible el lugar en que acabe situándose un trozo de material genético manipulado que se introduce en una planta o animal; además, la integración de dicho material genético manipulado en un cromosoma produce cambios y destrozos cerca del lugar de inserción y también en zonas alejadas del mismo cromosoma o de otros, pudiendo romper el cromosoma. Al contrario de lo que ocurre con el ADN propio, **no hay mecanismo de reparación para el ADN extraño** incorporado. Esto convierte en humo las promesas de superplantas o superanimales que tendrían propiedades ventajosas estables y permanentes
  - Para introducir en una planta o un animal el material genético manipulado, los fabricantes tienen que utilizar unos interruptores genéticos durísimos provenientes de virus realmente existentes que, al dispararse, obligan a la célula a realizar la información genética contenida en el trozo extraño. Además, añaden una 'cola' que hace que el pedazo que contiene la nueva información genética no pueda ser eliminado (digerido). Esto convierte a los 'alimentos transgénicos' en vehículo de auténticas bombas-de-relojería genéticas que pueden dispararse en cualquier momento con consecuencias imprevisibles.
  - Las proteínas humanas son tridimensionales. Esto permite declarar nulamente fiables los llamados 'tests de anticuerpos' utilizados para fabricar enfermos de "hepatitis B ó C", de SIDA, etc., ya que utilizan proteínas lineales. Las bacterias no pueden dar a las proteínas que elaboran el carácter tridimensional específico de cada proteína humana. Esto hace inevitable que los 'medicamentos' obtenidos por biotecnología genética puedan tener graves efectos secundarios (alergias, reacciones autoinmunes,...).
  - La técnica de detección de material genético llamada hibridación tiene fuertes limitaciones técnicas intrínsecas. Esto convierte en criminales los llamados 'tests genéticos' que detectan supuestas mutaciones en supuestos genes supuestamente responsables de cáncer, y que llevan a amputaciones 'preventivas' irreparables de mama, de útero,... (hay más de 1.200 mutaciones registradas para el mismo 'gen BRCA-1' considerado como responsable del cáncer de mama, y estas mutaciones aparecen en los mismos porcentajes en las mujeres con cáncer de mama que en las mujeres sin cáncer de mama... ¡e incluso en los hombres!). No hay base rigurosa alguna que justifique la llamada 'huella genética' y el llamado 'carné genético'.
  - **Las mitocondrias de la célula de la que se extrae el núcleo quedan en la célula desechada**, mientras que este núcleo es insertado en otra célula que ya tiene sus propias mitocondrias. Esto sólo ya convierte a la clonación (obtener organismos **idénticos** que desarrollarían iguales características) en una manipulación comercial de la que 'oveja Dolly' (monstruo sobreviviente entre los cadáveres de cientos de intentos fallidos) es tan sólo su escenificación.

Stefan Lanka concluye que "son importantes las razones éticas para exigir que la Ingeniería Genética sea inmediatamente paralizada, pero las razones científicas son definitivas. Además de bioética, debe haber veracidad científica en las notificaciones".

También otros científicos consideraban que "la dispersión en el ambiente de cultivos transgénicos es un Crimen contra la Humanidad", mientras que los genetistas del ISIS (Institute of Science on Society) denunciaban "the bad science" que estaba alterando la realidad científica al dictado de las Corporaciones, causando daños irreversibles a la salud humana y la Biosfera.

**3º).- En 1999 ya habían aparecido estudios independientes sobre los peligros de los vectores utilizados**, como el "CaMV 35S promoter, A recipe for disaster", publicado en 1999 en Microbial Ecology por Mae Wan Ho, Joe Cummins y Ángela Ryan. En el estudio se desvelan los graves peligros ambientales derivados de la liberación ambiental de construcciones virulentas sintéticas polivalentes que atraviesan la "barrera entre especies".

#### **4º).- Evidencias de daños ambientales.**

Desde 1998 ya era conocido, entre otros, el estudio de Altieri: “Riesgos ambientales de los cultivos-MG” . Hay que destacar que de todos los peligros que anuncia Altieri , muchos ya se habían materializado (como se acredita en las referencias del documento: Fallo del transgén en 20.000 acres de algodón-Bt de Texas o en 5.000 acres del delta del Mississippi, la formación de supermalezas resistentes a los plaguicidas, etc) , pero otras advertencias luego comprobadas experimentalmente (inducción de resistencias cruzadas a múltiples antibióticos, aparición de virus nuevos o adquisición de mayor patogenicidad de los existentes, facilidad de salto de enfermedades víricas que eran específicos de una especie hacia otras especies, etc) eran ciertas por la propia naturaleza de las leyes bióticas que rigen el funcionamiento de los genomas, sin necesidad de experiencia previa ni de establecer una relación concreta de la relación “causa-efecto” (del mismo modo que sabemos sin experimentarlo que cuando el pedúnculo de un membrillo no puede sostener su peso, este caerá en su vertical, más la deriva que pueda causar la intensidad instantánea del viento).

Al tiempo que en el aspecto científico se derrumbaban los “dogmas fundamentales de la Biotecnología”, ya se iban documentando los daños causados por los cultivos transgénicos, confirmando lo que había sido previsto por los científicos críticos. Se documentan numerosos casos de contaminación genética de plantas silvestre, la contaminación masiva de cultivos convencionales y ecológicos por transgénicos, la aparición masiva de supermalezas resistentes al glifosato, la pérdida de diversidad en flora y fauna, junto a los estragos en las poblaciones de predadores de plagas, la adquisición por las plagas de resistencia a los cultivos-Bt a mucha mayor velocidad de lo previsto por los científicos críticos y los ecologistas (por lo que se estableció la obligación en los campos de cultivo de maíz transgénico de EEUU o Canadá de sembrar hasta un 20% del maíz normal ).

Estudios en el Reino Unido mostraron que las alergias a la soja (que antes eran muy raras) aumentaron exponencialmente según una curva ascendente que era igual a la gráfica de la introducción de soja transgénica en la alimentación. También había surgido la alarma entre las Instituciones sanitarias por la inusitada aceleración de la adquisición por los patógenos de resistencias a los antibióticos, atribuida a la presencia del **gen nptII** en los cultivos transgénicos . Esto sería despreciado por los técnicos en bioseguridad de la Junta de C y León, afirmando que la aportación del gen nptII era despreciable en relación al uso masivo y cotidiano que se había hecho de los cócteles de antibióticos; abuso que era cierto, (y denunciado inútilmente en su momento por los ecologistas) pero que no explicaba la aceleración de las resistencias precisamente cuando hacía algún tiempo que ya se había limitado su prescripción médica. Demuestra un concepto equivocado de la genómica funcional, ya que es muy distinta y mucho más lenta la progresión de la resistencia por mutaciones adaptativas o por la progenie del mínimo de bacterias naturalmente resistentes, que la adquisición directa del gen de resistencia y su distribución a todo el universo bacteriano; como ya había sido advertido por los genetistas del ISI-S.

#### **Conclusión :**

**En el año 2000 había conocimientos científicos y experiencias prácticas suficientes para prohibir las liberaciones ambientales de cultivos-MG, no solo para cumplir con el elemental “Principio de precaución”, sino por la constatación de efectos adversos y de una “contaminación genética” que, a diferencia de cualquier otra, es irreversible, se auto-propaga y se reproduce.**

## ANEXO II.

Los avances en Genómica y experiencia sobre los cultivos-MG desde el año 2000 hasta ahora.

Desde el año 2000 hasta ahora diversas instituciones y comités científicos han realizado sucesivos estudios que han mostrado nuevos peligros de los cultivos transgénicos, y han confirmado los estudios críticos que habían sido cuestionados por la “ciencia oficial”. Son estudios de CRII-Gen (Comite de Recherches et d'Information independents sur le Genetique), GRAIN, nuevos estudios de ISI-S, estudio de riesgos encargado por varios Estados europeos, etc ....

En este tiempo se multiplican los casos de contaminaciones de cultivos convencionales y ecológicos por los transgénicos, con casos tan escandalosos como el del agricultor canadiense Percy Schmeiser cuyos cultivos fueron contaminados por los cultivos transgénicos vecinos y Monsanto le demandó por uso ilegal de semillas patentadas reclamando de indemnización un millón de dólares (además de que Percy tuvo que desechar su cosecha contaminada y gastar 175.000 \$ en juicios).

En España, al poco tiempo de su implantación, ya se detectan campos de cultivos ecológicos contaminados por transgénicos, obligando a desechar la cosecha.

También se documentan diversos casos de apagón del gen transgénico, causando la destrucción de las cosechas. **El año 2000** ya estaban divulgados estudios como Horizontal gene transfer. “The Hidden Hazards of Genetic Engineering” de Mae Wan Ho, , así como los referentes a los peligros del promotor Ca Mv 35S ( revisado y confirmado en 2005, y coincidente con la investigación de R. Steimbrecher).

Con motivo del extraordinario despliegue de recursos científicos para la secuenciación del Genoma humano se produjo un gran avance en el conocimiento e interpretación del genoma. El resultado (presentado oficialmente el año 2003) resultó una sorpresa para la “ciencia oficial”, terminando por derribar todos dogmas que seguían sosteniendo, mientras se confirmaban todos los conceptos que habían sostenido los científicos críticos. Sorprende el escaso número de genes, no muy superior al de una mosca o gusano, y la mitad de genes que un grano de arroz: no es el número de genes el que determina la superior organización del organismo y el cerebro humano, sino la amplitud y complejidad de las interrelaciones entre los genes, junto factores extra-genéticos contenidos en el despreciado “genoma basura” o genoma silencioso que representa más del 97% del genoma. Luego sorprendería la mínima diferencia genética que nos diferencia de los grandes simios.

**El año 2002** ya son bien conocidos los efectos tóxicos del Roundup, con estudios como el Informe de Kraczewer “Toxicología del glifosato” , o el informe de Bigwood para el Gobierno ecuatoriano. También era conocida la aparición masiva que afectaba a grandes extensiones, de especies silvestres tolerantes al glifosato , convertidas en supermalezas resistentes al Roundup tras la aplicación de este.

**El año 2003** aparece el estudio “ Horizontal gene transfer of viral inserts from GM-plants to viruses”, realizado por Jonathan Lathan PhD y Ricarda Steimbrecher PhD . Es revisado en 2004 para la “GM-Science Review Meeting” de la Royal Society de Edimburgh como “ GM-Flow. Scale and consequences for Agrculture and the Environment”.

En estos estudios se hace una revisión de las transferencias al ambiente de los insertos de los cultivos-MG, se constata que los genes y construcciones de ADN contenidas en los casetes insertados en los cultivos-MG, diseñados para atravesar la barrera de las especies e invadir sus genomas, tienen capacidad para provocar resistencias generalizadas en los patógenos haciéndoles intratables, para crear nuevas bacterias y virus patógenos, y para alterar profundamente la composición y funcionamiento de la Biosfera. Se denuncia que, ante la magnitud de los riesgos, se deben suspender las liberaciones al ambiente; se lamenta de que la comunidad científica está fallando en la denuncia de los riesgos, percibiéndose que no logra independizarse de las presiones comerciales; finalmente hace un llamamiento a los miembros de la comunidad científica para que expresen su punto de vista abierta y explícitamente.

También aparecen otros estudios encargados a la Royal Society por el Gobierno del Reino Unido, que son el primer análisis a gran escala realizado sobre el impacto ambiental de los transgénicos, demostrando que los daños ambientales eran mucho mayores de lo que se pensaba, afectando a los agentes polinizadores (abejas mariposas) y a otros insectos, a las flores silvestres, a los pájaros, etc.

Aún más negativo fue el estudio realizado por English Nature, organismo gubernamental para la protección de la fauna y flora, resultando que en los campos en que se utilizó el Roundup la producción de semillas se redujo a la quinta parte, además de reducirse en un 25 % la fauna y flora locales. Estimaron que de continuar los cultivos transgénicos desaparecerían las alondras de los campos ingleses. En el entorno de los campos sembrados con remolacha transgénica se detectó un 40 % menos de flores que en los campos próximos no transgénicos.

Las compañías de Seguros declararon que no suscribirían seguros de responsabilidad a los agricultores de cultivos transgénicos.

También aparecen en 2003 estudios (como en Biosafety) mostrando que ya entonces los cultivos-MG



incrementaban el consumo de plaguicidas.

- Estudios en Dinamarca y en el Reino Unido muestran la contaminación por glifosato del agua potable por encima de niveles autorizados.

- Varios estudios (como los de de Bigwood ) muestran el incremento de la infección de tierras de cultivo por el hongo **Fusarium** debida a la aplicación del Roundup. El Fusarium es un moho muy peligroso: en Michigan, se estimó que entre un 30 y un 40% de los cultivos fueron destruidos durante 2002 por la plaga de Fusarium. Cuando pasa a la cadena alimenticia, las epidemias de Fusarium pueden tener efectos mortales: en 2001 causó una serie de efectos mortales entre mexicano-estadounidenses consumidores de tortillas en Brownsville, Texas. La científica Myriam Fernández del "Semiarid Prairie Agricultural Research Centre" en Swift Current, Saskatchewan, confirmaría que el trigo tratado con glifosato sufre niveles más elevados de ataque por *Fusarium head blight* que los campos de trigo a los que no se ha aplicado glifosato".

**El año 2004** se avanzó mucho en el conocimiento del "ADN silencioso". Diversas investigaciones desvelaron algunas de sus importantes funciones para la expresión de los genomas. Estos descubrimientos serían considerados como algunos de los mayores avances científicos del año 2004.

En este año también se publicaron estudios muy importantes demostrando que la alteración en el genoma de las plantas transgénicas producida por la casete transformadora insertada es mucho más profunda de lo afirmado en las notificaciones, que nunca son ciertas las notificadas como "única inserción del transgen", que el genoma de la planta modificada es intrínsecamente inestable, etc etc. Los Gobiernos de varios Estados europeos (Austria, Reino Unido, Francia, Suecia, etc) encargan estudios sobre los riesgos de los cultivos-MG. El informe encargado por Gobierno austriaco, con la participación de varias Instituciones y universidades, es muy amplio ( 730 páginas), se refiere a la evaluación de riesgos de los OMG en la Unión Europea y sus conclusiones son muy críticas. Entre esos estudios se encuentran:

- "Risk Assessment of GMO products in the European Union", realizado por A. Spök, H. Hofer, P. Lehner, R. Valenta, S. Stirn y H. Gaugitsch . Estudio encargado por el "Bundesministerium für wirtschaft und Arbeit"
- "Genome Scrambling . Transformation-Induced Mutations in Transgenic Crop Plants", realizado por Allison. Wilson PhD, J. Latham PhD y R. Steinbrecher PhD.
- nuevos estudios realizados por científicos independientes de todo el mundo como "The Institute of Science in Society", el Independent Science Panel , The Unión of Concerned Scientists, los científicos independientes del CRII-GEN. nuevos estudios encargados por el Gobierno de Austria etc,

Todos ellos muestran la insuficiencia de los análisis de riesgos para la salud de los OMG y la ausencia prácticamente total de la investigación y evaluación de los riesgos para el ambiente. Se comprueba la contaminación genética en el Medio Ambiente debida a los cultivos transgénicos y la sorprendente falta de investigación sobre los peligros ambientales; la inexactitud de las comunicaciones de las Corporaciones que se referían a una "única y simple inserción"; la amplia distorsión de todo el genoma receptor debida a la inserción del transgen, la **diferencia sustancial** de las plantas transgénicas con las plantas normales, etc .

También se revisa por el ISI-S el anterior estudio "Cauliflower Mosaic Viral Promoter- A Recipe for Disaster" de Mae Wan Ho, Angela Ryan, y Joe Cummins al que se añaden otros muchos estudios acerca del CaMv 35S que son coincidentes con las investigaciones de otros genetistas, como "The CaMv 35S Promoter. Government and Corporate Scientific incompetence: Failure to assess the safety of GM-crops", por R.A. Steimbrecher.

### **Año 2005.**

Este año la EFSA , ante la protesta de algunos Estados miembros, y su petición para que se revisen las autorizaciones de cultivos transgénicos, emite su opinión sobre el maíz 1507:

"Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/ES/01/01) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507 for import, feed and industrial processing and cultivation, under Part C of Directive 2001/18/EC from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds1 (Question No EFSA-Q-2004-072)".

El panel científico, debía evaluar y verificar la **aprobación de comercialización** que España había regalado a Pioneer, abriéndole así las puertas de toda la comunidad europea gracias a la incompetencia o connivencia de las Instituciones científicas y políticas españolas encargadas de la bioseguridad.

La EFSA, cuya sumisión o connivencia con las corporaciones biotecnológicas la habían desprestigiado al nivel de la FDA estadounidense <sup>(1)</sup>, realiza un estudio insuficiente y defectuoso, que calca los pasos y criterios de las empresas notificadoras. Es llamativo el punto 4.2.4 del informe referente a los ensayos de toxicidad del maíz, en los que se hacen ensayos con ratas durante tres meses, en cuya alimentación se incluye un 33% del maíz transgénico obtenido de plantas que no habían sido tratadas con glufosinato . Después de enumerar una larga serie de daños en múltiples órganos de las ratas concluye que el resultado es satisfactorio y no levanta dudas sobre la seguridad del maíz-1507. A la "benevolencia" de las conclusiones desdeñando los daños observados, se añade que los ensayos debería haber sido de mayor duración; en diversidad de condiciones ambientales; con doble número de ratas, observando en la mitad los efectos durante la preñez y en la siguiente generación; utilizando el maíz de plantas que **sí** hubieran sido tratadas con el glufosinato; no se utilizaron las mejores técnicas de análisis disponibles, etc.

**Grupo Especial de la Comunidad Europea.**

Siendo ya insostenibles los asertos contenidos en las notificaciones de las Corporaciones biotecnológicas, siendo notoria la incompetencia o parcialidad del “Scientific Panel on Genetically Modified Organisms (GMO Panel) of the European Food Safety Authority (EFSA), y ante las protestas y denuncias de numerosos científicos de todo el mundo y el resultado de sus investigaciones, se crea un Grupo Especial para responder a un amplísimo temario de cuestiones formuladas por las Comunidades europeas referentes a los riesgos de los cultivos-MG, que es asesorado por un equipo de expertos (Doctores Andow, Snow, Snape, Squire y Dr<sup>a</sup> Nutti ), entre los que no se encuentra ninguno de los científicos críticos con la aprobación de los cultivos-MG. Algunos han estado relacionados con investigaciones patrocinadas por las Corporaciones, y todos muestran gran prudencia, incluso temor, al formular sus contestaciones críticas.

La Dr<sup>a</sup> Nutti representó oficiosamente los puntos de vista de las Corporaciones, hasta extremos deontológicamente inconcebibles por lo que llegó a ser recriminada.

El Dr Snape critica ampliamente la (deliberada) indefinición y confusión de las Notificaciones, así como los propios criterios de orientación y metodología establecidos por la EFSA, como el “EFSA-Q-2003-005” , que facilitan la confusión e indeterminación de las Notificaciones. (nº 49 al 56)

El Dr Andow discrepa con algunas respuestas que no consideran significativos algunos de los riesgos derivados de los cultivos-MG, o que consideran asumibles riesgos que a su entender son graves e inasumibles. Considera que un transgen puede causar efectos imprevistos a través de unos mecanismos que, realmente, son todos los que determinan la expresión genómica (1187).

El evasivo Dr Squire escapa resbaladizo de contestar concretamente. Aunque queda establecido lo obvio (que la coexistencia es imposible, y que las medidas que se adopten solo sirven para retrasar que la contaminación genética rebase cierto nivel, pero no para evitarla) señala unas prácticas inverosímiles para limitarla a niveles bajos, cuyo cumplimiento es irreal ( dejar sin cultivar varios años hasta que las semillas-MG adventicias se descompongan naturalmente, etc).

Gran parte de las preguntas planteadas quedaron sin respuesta, pero quedaron asentadas muchas de las cuestiones planteadas:

- Se confirma que los fragmentos de ADN sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal (79).
- Se confirma que se integra ADN de los insertos en bacterias incluso en regiones con poca similitud, que los genes de resistencia insertos en los transgénicos también incluían genes adyacentes, que la bacteria expresó el gen adquirido , etc (90)
- Se confirma que la integración de genes a bacterias del suelo es mucho más fácil de lo que se pensaba, y que los genes de resistencia facilitan la integración de otros genes en las bacterias (92)
- Que el gen de resistencia se trasmite por la simple circulación de bacterias en el ambiente .... **por contaminación con el suelo de heridas a los agricultores** o jardineros (113).
- Se admite que es desconocida del 95 al 99% de la flora bacteriana del suelo (114).
- Que el ADN intacto (desnudo) puede persistir mucho tiempo en la Naturaleza (117). Ya había sido documentada su persistencia de un año en determinados suelos arcillosos o su permanencia por tiempo indefinido en los biofilms quiescentes
- Que las mismas estrategias para disminuir la pérdida de diversidad que ocasionan los cultivos transgénicos, (como es reservar para cultivo normal un 25% de la superficie de parcela dedicada a cultivo-MG) aunque tiene cierta eficacia en unos sitios, es ineficaz en otros lugares como Australia (129) .
- Que una planta de remolacha transgénica produce en la campaña siguiente un promedio de **18 plantas adventicias de remolacha transgénica** (219).
- que no es correcto considerar la falta de pruebas (de la relación causa-efecto de un daño atribuido a los cultivos o alimentos transgénicos) como prueba de la inexistencia de tal efecto, y menos como prueba de inocuidad (326).

La D<sup>a</sup> Nutti, siempre acorde con los criterios (es decir, con los intereses) de las corporaciones, descarta la necesidad de pruebas sobre los **alimentos completos** , así como que se realice cualquier estudio de **toxicidad crónica**. (904). Considerar innecesarios estudios de **toxicidad crónica** es algo tan indefendible científicamente como sería afirmar hoy que la tierra es plana: solo puede provenir de increíble ineptitud o de corrupción desvergonzada. Las Corporaciones de transgénicos se acorazan en este punto puesto que (como probablemente habrán comprobado en los ensayos confidenciales no publicados) los daños sanitarios más previsibles de la contaminación genética (aparte de alergias etc) son la generalización pandémica de enfermedades degenerativas a largo plazo, ( iniciación de las primeras etapas de la cancerización por daños sobre el ADN, bloqueo de un checkpoint alterando la reparación de los daños, inducción de otras alteraciones en el funcionamiento de la apoptosis programada; disrupción endocrina; simuladores hormonales que alteran el flujo hormonal durante el embarazo; inducción de alteraciones en las pautas de plegamiento de las proteínas, lo que aumenta el riesgo de todas las enfermedades derivadas de los **priones** etc).

Las Corporaciones biotecnológicas no pueden tolerar que se investigue abierta y públicamente sobre los efectos a largo plazo, degenerativos, durante la gestación y transgeneracionales derivados de la liberación al Medio Ambiente de cultivos transgénicos y Roundup, como tampoco pueden reconocer que son conocedores de esas consecuencias (que sería inculparse de cometer crímenes contra humanidad). Lamentablemente la comprobación experimental de los mecanismos que originan la enfermedades degenerativas y transgeneracionales necesitan investigaciones y observaciones clínicas durante varias décadas hasta su reconocimiento por la Ciencia Oficial, que siempre llega cuando se han producido daños **irreversibles** (caso de los plaguicidas, el cambio climático etc).

En este año 2005 ya hay numerosos conocimientos genómicos consolidados científicamente, algunos de los cuales expusimos en anteriores alegaciones (Anexo ).

**El año 2006** están en marcha diversos estudios de efectos nocivos de los cultivos-MG a largo plazo, y se publican diversos estudios, principalmente sobre los efectos nocivos que se multiplican dramáticamente en Latinoamérica debido a la masificación de los cultivos transgénicos gracias a la connivencia de los Gobiernos y a las presiones conminatorias de OMC, BM, FMI ( que han representado masivos “crímenes contra la humanidad” hasta ahora impunes, a pesar de su tipificación jurídica). Se publican por Grain, Biodiversidad en América Latina, etc. Una investigación desarrollada por la Academia de Ciencias de Rusia descubrió que más de la mitad de los hijos de ratas alimentadas durante el embarazo con soja-MG tratada con Roundup morían en las tres primeras semanas de vida, un índice seis veces superior al registrado en los descendientes de las ratas con dietas normales. Además, el índice de ratas nacidas con un severo bajo peso es también seis veces superior en las primeras dos semanas antes de la concepción y se prolongó durante el embarazo, nacimiento y lactancia. (Londres. 09/01/06 ).

Se multiplican los informes en todo el mundo sobre invasiones masivas de malezas tolerantes al glifosato, que se han convertido en “supermalezas” resistentes prevaleciendo sobre otras adventicias y propagándose rápidamente.

Un estudio muy amplio es “La evolución y diseminación de la resistencia del Sorghum halepense al glifosato en Argentina” informe para SENASA de B. Valverde y Jonathan Gressel. La triste realidad de la agricultura argentina es que ya no puede certificar ningún producto ecológico ( siendo anteriormente el mayor exportador); que se está degradando aceleradamente la fertilidad natural de millones de hectáreas (por tanto su capacidad de regeneración de los recursos renovables); que las tierras de cultivo se infectan masivamente por supermalezas, y que se han causado daños graves y permanentes a la salud de la población. Esto además de los atentados sociológicos y contra los Derechos Humanos derivados de estos macro-cultivos transgénicos en Argentina y en toda Latinoamérica. **Esta es la senda que por ahora está siguiendo la Región de Castilla y León.**

**El año 2007** se publican los resultados de algunas de las investigaciones que se venían realizando.

- Se publican varias recopilaciones, como “impactos del glifosato en el Medio Ambiente” de Elizabeth Bravo. (Doc 1)

- Se confirma que el glifosato daña el ADN humano , en el estudio de César Paz y Miño, director de Genética Molecular Humana en la Universidad Católica de Ecuador.

- Se confirma que daña los embriones humanos: “ **Effects of the herbicide Roundup on human embryonic cells**”. Press Release CRIIGEN - May 2007. Committee for Independent Research and Information on Genetic Engineering

<http://webs.chasque.net/~rapaluy1/glifosato/Effects%20of%20the%20herbicide%20Roundup%20on%20human%20embryonic%20cells> según investigaciones del Dr Seralini de la Universidad de Caen.

- Se publican diversos informes sobre la creciente ineffectividad del Roundup en el control de adventicias, por lo que se considera que los cultivos-MG basados en la resistencia al Roundup está en extinción, resultando obsoletos ante el avance de las malezas resistentes al glifosato. Monsanto está desarrollando las plantas-MG resistentes al dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxi benzoico, tiene alta residualidad en los terrenos) para sustituir a los cultivos-RR resistentes al glifosato. (Doc 2).

- Se confirman los estudios que se venían realizando desde hace años acerca de la influencia del Roundup en la propagación de hongos Fusarium (Doc 3)

**El año 2008** . Ya no es posible alegar ignorancia sobre la propagación masiva de la contaminación genética y los daños causados. Los cultivos transgénicos violan los derechos más fundamentales .

Recordamos que:

- “Todas las personas tienen el derecho a disponer de alimentos que no han sido genéticamente modificados” . según el Art. 3 of the Genetic Bill of Rights (BDCRG, 2000).

- La coexistencia es reconocida imposible, en un corto plazo, que la experiencia ha demostrado ser mucho más breve de lo esperado, la contaminación genética llega a los cultivos naturales y ecológicos. Las medidas que se adopten solo pueden demorar el tiempo que transcurra hasta que se sobrepase el límite de contaminación establecido, pero nunca podrán evitarla.

- **La agricultura ecológica** resulta arruinada y aniquilada, siendo la única forma de mantener la auto-fertilidad de los suelos, lo que, a su vez, es la única fuente de sostenibilidad que existe sobre la corteza terrestre.

No hay sostenibilidad posible si se degrada la capacidad del suelo agrario y forestal para regenerar los recursos renovables, y estos recursos agrarios y forestales son insostenibles si su reproducción exige más insumos que los productos que proporciona. Mientras la agroecología proporciona al menos 7 calorías por cada caloría de insumos, en la agricultura industrial para obtener una caloría de productos se gastan 7 calorías ( y/o se degrada en esa proporción la capacidad del terreno agrícola para regenerar las materias primas renovables).

La ruina de la agricultura ecológica es tanto más intolerable cuando han sido necesario muchos esfuerzos, inversiones y tiempo para la regeneración edáfica de los suelos degradados por la agroquímica, pero **desaparece todo horizonte de continuidad ante la segura contaminación genética.**

- La salud humana se resiente. Desnutrición, inmunodeficiencia y obesidad son una pandemia que se extiende entre una población que ingiere calorías en exceso, pero carentes de los oligoelementos precisos para una nutrición correcta.
- La aberrante promoción de los agrocombustibles amenaza (o es ya una realidad) con la multiplicación de los cultivos-MG basándose en el falso argumento de que no son productos de alimentación, ignorando la mayor amenaza para la salud y el Ambiente derivada de la contaminación genética generalizada. Igualmente, y apoyándose en dicha falacia, se está preparando en España la introducción de árboles-MG.
- En Francia se anuncia al comenzar el año que se acoge a la cláusula de salvaguardia para rechazar cultivos-MG, un primer paso necesario aunque insuficiente.
- En España, se sale de la atonía ciudadana y de la pasividad o complicidad de los científicos con el manifiesto: “ Democracia, precaución y medio ambiente” . Declaración de investigadores y representantes de la población civil sobre las aplicaciones de la biotecnología en la modificación genética de plantas, ante los peligros que representa. (Doc 4).
- Diversa documentación reciente, así como el documental emitido en el Canal Odisea el día 24 de este mes a las 22,00 h, muestran la enorme dificultad y coste necesarios para la regeneración de los suelos degradados o desertificados por las actuaciones humanas imprudentes. En el caso de Islandia, es ejemplar el empeño de los agricultores, fuertemente apoyados técnica y económicamente por la Administración, para la recuperación de terrenos (que fueron bosques y praderas, pero posteriormente fueron talados y desertificados) con un coste monetario que llega al medio millón de euros por cada hectárea de tierra recuperada.

Mientras tanto, y a pesar de todas las experiencias acumuladas en todo el planeta, en España en general, y muy particularmente en la Región de Castilla y León, ni se apoya adecuadamente la regeneración de los suelos, ni se hace un seguimiento de la degradación de los suelos agrícolas y forestales, y además se incide en promocionar las actividades que producen mayores y más graves impactos contra el Medio Ambiente, al tiempo que facilitan la fragmentación del territorio y de los Espacios Naturales. Todo ello precisamente en una región cuya vocación y desarrollo potencial radica en una producción alimentaria de gran calidad.

## **Anexo II , Documento 1º.**

**Impactos del Glifosato en el Medio Ambiente .** Recopilación hecha por Elizabeth Bravo.

### **INTRODUCCION**

El glifosato es un herbicida sistémico que actúa en post emergencia, no selectivo, de amplio espectro, usado para eliminar malezas que pueden ser pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas.

De acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, la tasa recomendable de aplicación no debe exceder a 5,8 Kg. de ingrediente activo por Ha (World Health Organization, 1994)

El glifosato inhibe la síntesis de los amino ácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), a través de interferir en la ruta metabólica del ácido sikímico. A partir del ácido sikímico se produce además otros productos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y fitohormonas, De hecho, un 20% del carbono que es fijado en la fotosíntesis es utilizado en esta ruta metabólica.

La ruta metabólica del ácido sikímico está presente en plantas y microorganismos. Estudios hechos por Bode y colaboradores (1986) en 19 estirpes de levaduras Ascomicetes y Basidiomicetes demostraron que el glifosato también inhibe la actividad de la enzima 5 enolpiruvilsikimato 3 fosfato (EPSA) como ocurre en las plantas.

En plantas, el herbicida es absorbido a través de las hojas y transportado al resto de la planta, donde actúa en su sistema enzimático.

El glifosato es un ácido, pero se usa comúnmente como sal, siendo la forma más utilizada la sal isopropilamina<sup>[1]</sup> (IPA) de N-(fosfonometil) glicina, o sal isopropilamina de glifosato. Es altamente soluble en agua y prácticamente insoluble en solventes orgánicos.

Su nombre comercial más conocido es Roundup patentada por Monsanto. Existen varias formulaciones que se caracterizan comúnmente por contener 480 g/L de sal IPA de glifosato y el surfactante POEA (polioxietil amina)<sup>[2]</sup> . POEA, pertenece a la familia de alquilaminas polietoxiladas sintetizadas de ácidos grasos de origen animal.

El Roundup usado normalmente en la agricultura contiene 41 por ciento de sal IPA de glifosato, y el Roundup Ultra utilizado en la erradicación de cultivos ilícitos, contiene 43,9 por ciento del ingrediente activo (Nivia, 2001).

### **DESTINO AMBIENTAL DEL GLIFOSATO**

El glifosato ha sido fabricado para ser aplicado directamente a las hojas de las plantas, pero "aunque el glifosato no se aplica directamente a los suelos, una concentración significativa del compuesto puede llegar al suelo durante una aplicación" (Haney, Senseman, Hons, Zuberer, 1999).

Una vez en el suelo, hay diferentes procesos que determinan el destino final del glifosato:

- Ø Las formación de complejos con agua iones de Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>
- Ø Sorción en sedimentos o partículas suspendidas
- Ø Partículas suspendidas en el agua y el suelo
- Ø Entra en el metabolismo de las plantas
- Ø Biodegradado por micro-organismos

Algunas bacterias pueden degradar el glifosato usándolo como fuente de Carbono, Fósforo y Nitrógeno. Uno de los principal metabolito en la degradación del glifosato en ambientes terrestres es el ácido aminometilfosónico (AMPA), que tiene una estructura similar al glifosato.

El glifosato puede contener trazas de N-nitroso glifosato. Este compuesto puede formarse en el ambiente al combinarse con nitrato (presente en saliva humana o fertilizantes). La mayoría de compuestos N-nitroso son cancerígenos y no existe nivel seguro de exposición a un cancerígeno. El formaldehído, otro carcinógeno conocido, es también un producto de descomposición del glifosato (Cox, 1995; Dinham, 1999).

Cantidades mínimas del herbicida pueden causar daño a cultivos. Uno de los primeros boletines técnicos de Monsanto (MON-057-1-71) afirmaba que "las aplicaciones aéreas deben evitarse si existe peligro de que el químico se ponga en contacto con especies no objetivo".

### **MOVILIDAD**

Aun que se afirma que el glifosato es poco móvil en el suelo, sin embargo algunos estudios científicos ponen en duda esta afirmación.

Por ejemplo se ha encontrado que la absorción del glifosato varía de acuerdo a los tipos de suelos. Hay una menor absorción en suelos con bajos contenidos de Óxido de Hierro (Piccolo y Celano, 1994). El contenido de minerales en la arcilla puede jugar también un papel importante.

Piccolo y Celano (1994) encontraron que en algunos tipos de suelos se libera el 80% del herbicida absorbido, mientras que otros liberan entre el 15 – 35%.

Hay suelos que no pueden retener al glifosato el tiempo suficiente para que haya degradación microbiana, y en

esos casos el herbicida es muy móvil. Este glifosato liberado puede percolarse a los niveles más bajos del suelo.

El glifosato puede unirse a sustancias hidrosolubles del humus. Las sustancias húmicas son las principales responsables de la movilidad de los pesticidas en el suelo. El glifosato transportado por las sustancias húmicas, pueden también entrar en los niveles más profundos del suelo (Piccolo y Celano, 1994).

Un estudio hecho por Morillo, Undabeytia y Maqueda (1997) revela que la absorción del glifosato disminuye con la presencia de cobre, debido a la formación de complejos glifosato-cobre. Este estudio concluye que para entender la relación entre el glifosato liberado y su movilidad en el suelo, es necesario tener en cuenta el tipo de suelos y los elementos presentes en el suelo capaces de formar complejos con el glifosato.

Se ha encontrado también que la materia orgánica presente en el suelo, compite con el glifosato por los sitios de absorción (Gerritse, Beltrán y Hernández, 1996).

Los suelos del Ecuador se comportan diferente que otros suelos en países tropicales. El glifosato podría ser más móvil que en otros suelos tropicales.

El glifosato puede entrar en aguas superficiales cuando se aplica cerca de los cuerpos de agua, por efecto de la deriva o a través de la escorrentía. Puede haber un proceso de percolación hacia las aguas subterráneas.

Dependiendo de los sólidos suspendidos y de la actividad microbiana, el glifosato puede transportarse varios kilómetros río abajo (CCME, 1989).

#### **PERSISTENCIA.**

Otra afirmación que se hace en relación al glifosato es que este herbicida se inactiva y degrada rápidamente en el suelo. La Agencia Ambiental de Estados Unidos ha reportado que la vida media del glifosato[3] en el suelo puede ser desde 60 días según (EPA, 1999). La EPA añade que en estudios de campo los residuos se encuentran a menudo al año siguiente.

A continuación se presentan algunos datos sobre la persistencia del glifosato en distintos ambientes, recopilados por Cox (1995):

Ø 249 días en suelos agrícolas de Finlandia

Ø Entre 259 y 296 días en 8 sitios forestal en Finlandia

Ø Entre 1 y 3 años en 11 sitios forestal en Suecia

Ø 335 días en un sitio forestal en Canadá

Ø 360 días en 3 sitios forestales de Canadá

Ø Dos estudios canadienses encontraron que el glifosato puede persistir entre 12 y 60 días en un cuerpo de agua luego de una aplicación directa.

Ø Se encontró residuos de glifosato en los sedimentos de una laguna un año después de su aplicación directa en Estados Unidos

Estudios en Noruega detectaron glifosato en aguas superficiales y subterráneas (ENDS Daily, 1999).

Estudios hechos en bosques del Canadá sobre la persistencia del glifosato en el suelo, encontraron que en suelos de bosques canadienses, estos pueden persistir entre 45 y 60 días. Luego de 360 días se encontró aun una presencia del 6 al 18% de los niveles iniciales tanto en el suelo como en los residuos vegetales (Bell et al, 1997).

Welter et. al (2000) determinó que el glifosato puede adherirse a partículas del suelo y puede todavía ser tóxico y biodisponible a organismos que se alimentan por filtración, tales como crustáceos y moluscos, así como a otros organismos que injieren cantidades significativas de suelo durante su alimentación normal, incluyendo peces, aves que se alimentan en las playas de los ríos, los anfibios, y algunos mamíferos.

Se ha encontrado que el AMPA es más persistente que el glifosato. Se han reportado vidas medias para este compuesto de entre 199 y 958 días (WHO, 1994).

Aunque el efecto del glifosato como químico por sí solo haya sido investigado en algunos tipos de suelos, los efectos de los surfactantes y otros aditivos utilizados en las formulaciones de aspersión aparentemente no han sido investigados en suelos.

#### **Las aspersiones aéreas con glifosato, pone en riesgo esa biodiversidad.**

Un estudio en base a imágenes Landsat Enhanced Thematic Mapper Plus (ETM+) llevadas a cabo por un equipo de la Universidad del Estado de Michigan en la región de Putumayo de Colombia, donde se ha aplicado aspersiones con agentes defoliantes para erradicar las plantaciones de coca (Messina y Delamate, 2006) encontraron que este programa impactó no solamente a los cultivos ilícitos, sino también a fincas sembradas con cultivos alimenticios y bosques nativos.

Ellos encontraron que se había afectado 106.178 ha, a pesar de que el United Nations Drug Control Program reportó que se había erradicado apenas 71 891 ha. Hay pues una inexplicable diferencia de 34.287 Ha. dicen los autores.

## EL EFECTO DE BORDE

Los impactos del glifosato en el ecosistema boscoso no se limitan al área directamente afectada, sino que es mucho mayor debido al efecto de borde.

El efecto de borde afecta la composición de comunidades vegetales cerca del borde ocasionado por efectos del herbicida. Cerca del borde las especies típicas de una comunidad clímax, son desplazadas por especies pioneras. El efecto de borde afecta además la eco-fisiología de las plantas, por ejemplo su tolerancia a las variaciones de temperatura y humedad así como a su potencial hídrico (Kapos, Wandelli, Camargo y Ganade, 1997).

Puesto que el efecto de borde produce también cambios en el micro clima, que está fuertemente determinado por las comunidades vegetales presentes, este fenómeno también afecta a las comunidades microbiológicas (Stephen, Turton y Freiburg, 1997). Los efectos microclimáticos debido al borde fueron registrados hasta 30 metros dentro del bosque, a partir de la zona deforestada.

El efecto de borde afecta también a los microorganismos de la filofera los que están más expuestos a las variaciones térmicas, a las fluctuaciones de humedad y del potencial hídrico en el borde, que bajo la sombra.

En estudios hechos con invertebrados del suelo, se ha encontrado que las poblaciones de Coleópteros se afectan por el efecto de borde entre 100 y 210 metros en bosques que han sido perturbados (Dihám, 1997).

## IMPACTOS EN LAS INTERACCIONES ECOLÓGICAS

Los impactos ecológicos del programa de erradicación de cultivos ilícitos en los ecosistemas boscosos, no se pueden ser evaluados analizando únicamente las zonas deforestadas. Los cambios que producen en la estructura y funciones del bosque, afecta la interacción entre las comunidades biológicas, la sucesión ecológica y las redes tróficas, la disponibilidad de nichos ecológicos, alterando el equilibrio ecológico.

La alteración de determinadas poblaciones, puede tener efectos negativos en otras poblaciones de una misma comunidad biológica, produciéndose un fenómeno se llama "efecto cascada".

Por ejemplo, algunas poblaciones vegetales pueden ser especialmente vulnerables al glifosato o sus coadyuvantes. Estas plantas pueden ser el alimento de algunas especies de insectos, los mismo que se afectarán por falta de alimento, a su vez, hay si pájaros o anfibios que se alimentaban de estos insectos, y estos también se afectarán. Si hay otros animales que dependían para su alimentación de esos pájaros, también serán afectados, produciéndose impactos en toda la red trófica.

Estas mismas plantas pueden mantener relaciones simbióticas con otras especies que pueden ser epífitas, saprofitas, parásitas; con micro-organismos fijadores de nitrógeno o micorrizas. Impactos en estas comunidades vegetales significa la desaparición de nichos ecológicos y un desequilibrio en las interrelaciones biológicas existentes.

A nivel del suelo también habrán efectos negativos, porque posiblemente las plantas originales permitían que se desarrolle en el suelo un determinado tipo de comunidades micro-biológicas, las mismas que desaparecerán y el proceso de descomposición y el ciclo de nutrientes se alterará.

Por otro lado, dado que hay especies que son más susceptibles al herbicida que otras, habrá una selección de las especies más resistentes a la contaminación, alterándose la estructura ecológica del ecosistema.

Este tipo de fenómenos ya han sido reportados en el literatura científica. Estudios hechos sobre los impactos del glifosato en aves, han encontrado que este herbicida es moderadamente tóxico. Pero se ha identificado además efectos indirectos en las comunidades de aves, porque el glifosato afecta a las plantas o insectos de los que estos organismos dependen para su sobrevivencia, por tanto puede causar cambios dramáticos en la estructura de la comunidad de plantas afectando las poblaciones de aves, porque ellas dependen de las plantas para alimentarse, protegerse y anidar. Esto ha sido documentado en estudios de poblaciones de aves expuestas por glifosato en la costa Norte de Estados Unidos.

El impacto del glifosato en las redes tróficas se demostró en un estudio hecho en Australia donde se encontró que especímenes de 5 especies de pinzones nativos murieron luego de estar expuestas a semillas tratadas con glifosato (Evans y Batty, 1986).

Otros estudios han demostrado que las aves pueden afectarse por alteraciones de sus sitios de alimentación, de anidación, por cambios en la sucesión natural de los ecosistemas, o por disminución de sus fuentes alimenticias.

Esto hace que la densidad de poblaciones de aves disminuya, que se seleccionen algunas especies más tolerantes a ecosistemas alterados, desfavoreciendo a especies con requerimientos ecológicos más reducidos (MacKinnon y Freedman, 1993).

Resultados similares han sido encontrados en poblaciones de pequeños mamíferos. Estas poblaciones se han impactado negativamente luego del uso de glifosato para clarear el bosque. Estas especies perdieron sus fuentes alimenticias, especialmente plantas y artrópodos (Santillo et al, 1989; D Anieri et al, 1987; Richie et al, 1987).

Santillo y colaboradores (1989) en su estudio en el Estado de Maine encontraron que luego de la aplicación de glifosato, la composición vegetal se hacía menos compleja (Santillo, Brown, Leslie, 1989).

El impacto del glifosato en la sucesión ecológica boscosa fue estudiado por Bell y colaboradores (1997), quienes hicieron una investigación sobre el efecto del glifosato en el noroeste de Ontario – Canadá en bosques deciduos temperados. Ellos encontraron que el uso de este herbicida disminuía la cobertura vegetal de árboles deciduos, arbustos y helechos. En el caso de bosques de coníferas, ellos encontraron que el glifosato reducía la vegetación leñosa y herbácea. Es decir, ejercía un impacto en la composición y estructura de estos bosques.

Se han registrado además cambios en la fenología de plantas debido al efecto del glifosato. Un grupo de investigación del Reino Unido, estudió los impactos del glifosato y otros herbicidas en la vegetación de bosques marginales, barreras arbustivas y campos marginales que habían sido expuestos a estos plaguicidas en los últimos tres años, una vez por año (Marrs, Williams, Frost y Plant, 1989).

Ellos analizaron los efectos de dosis sub letales en la productividad de las especies, los patrones de floración, producción de semillas, variabilidad de semillas y la invasión de nuevas especies en estos espacios.

Ellos encontraron que todas las especies estudiadas habían sido impactadas negativamente por la deriva provocada durante las aplicaciones hechas con herbicidas. Pero el comportamiento de cada especie fue distinta, dependiendo de la estructura de la comunidad vegetal en la que se encontraban. Este estudio nos muestra que es extremadamente difícil extrapolar resultados toxicológicos entre una comunidad vegetal con otra.

Sin embargo, es necesario mencionar que cambios en la fenología en comunidades vegetales en bosques tropicales es un factor crítico para el equilibrio ecológico. Varios estudios se han hecho sobre la coevolución entre plantas y animales; y la relación entre la floración o fructificación de ciertas especies vegetales con la ecología reproductiva de determinadas especies polinizadoras, responsables de la dispersión de los frutos, etc. (Bawa y Hadley, 1990)

Cambios en la fenología de comunidades vegetales generados por efectos del glifosato, pueden interferir en estos procesos.

## **IMPACTOS EN EL CICLO DE NUTRIENTES**

Varios estudios demuestran el impacto que tiene el glifosato en comunidades de micro-organismos que juegan importantes roles en el ciclo de nutrientes.

Como es bien conocido, en los bosques tropicales el ciclo de los nutrientes está acelerado, almacenándose la mayor parte de la misma en la parte viva del sistema. Por eso la mayor parte de la producción primaria neta se utiliza en la producción de hojas y frutos. Este hecho está relacionado con la baja disponibilidad de nutrientes minerales en el suelo.

Por esa baja disponibilidad de nutrientes, en los bosques tropicales se desarrollan asociaciones entre las raíces de los árboles con ciertos hongos, formándose las micorrizas fúngicas. Éstas transfieren a las raíces nutrientes que provienen de la descomposición de la materia orgánica existente en el suelo. Este proceso permite que la escorrentía produzca pequeñas pérdidas de minerales, y determina la rápida circulación de estos.

También en el suelo se encuentran poblaciones de bacterias y cianobacterias, muy importantes en el mantenimiento de los altos valores de biomasa, puesto que son fijadoras de nitrógeno. Determinadas cianobacterias además forman parte de líquenes que igualmente intervienen en el ciclo del nitrógeno.

Dada la baja fertilidad de los suelos tropicales, un adecuado equilibrio en el ciclo de nutrientes, y de los micro organismos involucrados en cada uno de ellos, es vital.

## **BACTERIAS NITRIFICANTES**



Existe varios estudios que demuestran la interferencia del glifosato en los procesos de fijación de Nitrógeno, tanto en bacterias de vida libre como de bacterias que se establecen relaciones simbióticas con plantas.

En estudios hechos con soya transgénica con resistencia glifosato, Zablotowicz y Reddy (2004) encontraron que la bacteria nitrificante *Bradyrhizobium japonicum*, que fijan nitrógeno en las raíces de la soya, posee una enzima sensible al glifosato y que cuando está expuesta a este herbicida, acumula ácido shikímico y ácidos hidroxibenzoicos, lo que produce la inhibición del crecimiento y hasta la muerte de la bacteria en altas concentraciones. Se encontró además que el glifosato se acumula en los nódulos de las raíces de la soya. Esto repercute en el crecimiento de todas las plantas leguminosas (que establecen relaciones simbióticas con bacterias nitrificantes) y de la salud del suelo en general. Este herbicida afecta pues al ciclo del nitrógeno en agroecosistemas.

Este fenómeno también reportado por Hutchinson, (1995), Forlani, Mantelli, Branzoni, Nielsen y Favilli (1995).

Un estudio hecho en la India con suelos degradados provenientes de plantaciones de te tratados con glifosato, redujo colonias de bacterias fijadoras de Nitrógeno (Bezbaruah, et al, 1994).

Se ha reportado también una inhibición en la nodulación en raíces de trébol en suelos con niveles de glifosato de entre 2 y 2000 mg/Kg de glifosato. El efecto persistió 120 días después del tratamiento (Eberbach, et al 1983).

Se han hecho también estudios con bacterias nitrificantes de vida libre. Santos y Flores (1995) estudiaron los efectos del glifosato en la fijación de Nitrógeno en bacterias heterotróficas de vida libre. Ellos encontraron que dosis de glifosato superiores a 4 Kg/Ha inhibía la fijación de Nitrógeno. El herbicida afectaba también la respiración y causaba una reducción en el tamaño celular.

Dada la baja fertilidad de los suelos tropicales, la fijación biológica del Nitrógeno es vital para mantener el equilibrio de nutrientes en el suelo.

## **HONGOS MICORRIZAS**

La interferencia de glifosato en las relaciones entre hongos micorrizas, nutrientes y plantas fue publicado por Wan et. al en 1998. La relación micorrizal es una asociación simbiótica entre un hongo con las raíces de algunas plantas y árboles donde el micelio del hongo forma una estrecha cobertura tejida envolviendo las raicillas o hasta penetrando las células de las raíces. Esta relación provee un intercambio de nutrientes y agua que beneficia tanto a la planta como al hongo.

En una investigación hecha por un equipo canadiense dirigido por el científico M.T. Wan y colaboradores (1991) se identificó el efecto nocivo del glifosato en el hongo micorriza arbuscular vesicular *Glomus intraradices* en raíces de zanahoria. Dado que muchas plantas no pueden crecer sin esta relación micorrizal, este es un efecto posible de las fumigaciones con glifosato que debemos considerar.

En los suelos tropicales, varias especies de importancia comercial se asocian con micorrizas arbusculares vesiculares, las que juegan un papel fundamental en la absorción de fósforo, nutriente que es muy escaso en este tipo de suelos. Se ha reportado también que las micorrizas arbusculares vesiculares influyen en la nodulación en leguminosas para la fijación de Nitrógeno (Panos, 1980).

## **PROCESOS DE DESCOMPOSICIÓN DE MATERIA ORGÁNICA**

Los micro-organismos del suelos son los responsables de la descomposición de materia orgánica en nutrientes. Dado que el ciclo metabólico del ácido shikímico está también presente en micro-organismos, el glifosato los afecta adversamente, y por lo mismo, interfiere en los procesos de descomposición de la materia orgánica.

Un equipo de investigación egipcio estudió los impactos del Roudup en hongos del suelo y en la descomposición de materia orgánica. Ellos encontraron que el herbicida aumentaba la presencia de ciertas especies de hongos y disminuía otras especies. Se registró también disminución en la tasa de respiración y de descomposición de la materia orgánica (Abdel-Mallek et al, 1994)

En Argentina la utilización de grandes cantidades de glifosato asociada al cultivo de soja transgénica está afectando ya el equilibrio natural y la vida microbiana del suelo, originando problemas en la descomposición de la materia orgánica, y amenaza la biodiversidad y el futuro productivo de extensas comarcas (Joensen y Semino, 2004).

En Canadá se ha comprobado asimismo que el cultivo de colza resistente a herbicidas afecta a la biodiversidad y actividad microbiana en los suelos (Dunfield y Germida, 2001).

El glifosato tiene efectos negativos en nemátodos y otras lombrices e invertebrados (Dewar, Haylock, May, Beane, Perry, 2000). Una investigación en Nueva Zelanda mostró que el glifosato tenía efectos significativos en el crecimiento y sobrevivencia de lombrices comunes del suelo. Aplicaciones cada 15 días en dosis bajas (1/20 de la dosis normal), redujeron el crecimiento e incrementaron el tiempo de madurez y la mortalidad (Springett, Gray 1992; Cox, 1995).

## **AUMENTO DE ORGANISMOS PATÓGENOS**

El glifosato aumenta el crecimiento de hongos patogénicos según muchas investigaciones publicadas en la literatura científica. Como resultado, éstos hongos predominan en una área para liberar sus propias toxinas (micotoxinas), que son perjudiciales para muchas de las otras formas de vida cercanas, incluso mamíferos.

Uno de los géneros que tiende a aumentarse en presencia de glifosato es el género *Fusarium*. En Estados Unidos se ha observado que la utilización cada vez mayor de glifosato en la soya transgénica, incrementa los problemas de colonización de las raíces por *Fusarium* spp, un hongo que produce grandes daños en los cultivos y cuya presencia en los alimentos puede tener efectos nocivos para la salud humana, llegando a ser mortal en concentraciones elevadas (Kremer y Donald, 2003; Sanogo, Yang, Scherm, 2000; Wan et al, 1989, Delcalzo, Punja, Levesque y Rahe, 1989; Ojal y Rahe, 1984; Levesque, Rahe y Eaves, 1992; Levesque, Rahe y Eaves, 1993, Levesque, Beckenbach y Rahe 1993; Rahe, Levesque y Ojal, 1997; Wan, Rahe, y Watts, 1998).

La proliferación de este hongo patógeno es de especial importancia en el contexto del Plan Colombia, pues hasta septiembre del 2002, *Fusarium oxysporum* var. *erythroxyllum* iba a ser utilizado por el gobierno de los Estados Unidos como un micoherbicida en Colombia con el fin de erradicar la coca, pero esta propuesta fue rechazada por el Comité Andino de Autoridades Ambientales (CAAAM).

Especies del género *Fusarium* han sido responsables en todo el mundo por daños serios a muchos cultivos, suelos envenenados, defectos de nacimientos en seres humanos, y en un caso documentado, la muerte de miles de personas causadas por sus micotoxinas cuando éstas comieron cereales contaminados durante los últimos años de la Segunda Guerra Mundial (Marassas, Nelson y Tousson, 1984).

La literatura científica asocia a otros agentes patógenos con el uso de glifosato. Un estudio hecho por la Comisión Forestal del Reino Unido encontró que el 19% de barreras arbustivas de fresno, mostraban síntomas de dieback, una enfermedad del fresno que puede ser producida por una serie de agentes, pero que la Comisión Forestal la atribuyó, entre otras causas, al uso de glifosato (Forestry Commission, 1991).

Se ha reportado además que el uso de glifosato incrementa la patogenicidad y la sobrevivencia de *Gaeumannomyces graminis*, agente causal de la del pié del trigo ( ). Se observó también que por efecto del herbicida, disminuyeron los hongos del suelo que son antagonistas del patógeno, y que podrían reducir significativamente la incidencia de la enfermedad.

Se ha reportado que el glifosato incrementa además la susceptibilidad del fréjol a la antracnosis (cuyo agente causal es el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*) y la incidencia de *Rhizoctonia* en la pudrición de la raíz de cebada (Johal y Rahe, 1988; Smiley, 1992; Mekwatanakarn y Silvassithamparam, 1987).

## **EFFECTOS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS**

El glifosato puede contaminar cuerpos de agua superficial ya sea por aspergión directa, por efecto de la deriva, o porque este pesticida es lixiviado a los acuíferos.

Su persistencia en el agua es más corta que en el suelo, por su capacidad de sorción a partículas en suspensión como materia orgánica y minerales, a sedimentos o por efecto de la descomposición microbiológica. Sin embargo, puede persistir por más tiempo en los sedimentos.

Debido a los altos valores de precipitación existente en las zonas donde tienen lugar los programas de erradicación de la coca, el glifosato es rápidamente transportado por la escorrentía desde los suelos a aguas subterráneas.

La posibilidad de que el glifosato y sus coayuvantes contamine los cuerpos de agua superficial y subterránea en las regiones tropicales fronterizas del Ecuador donde tienen lugar los programas de erradicación de coca, constituye una amenaza seria para el equilibrio ecológico de las regiones afectadas, donde hay una gran cantidad de cuerpos de agua de los que dependen todas comunidades biológicas.

La región amazónica, es considerada como una de las mayores fuentes de agua dulce del planeta, y las cuencas

de sus ríos como las que albergan la mayor biodiversidad de peces en el mundo. La cuenca del Tiputini en la Amazonía ecuatoriana, posee el mayor número de peces de agua dulce a nivel mundial, para una cuenca hidrográfica de su tamaño (Barriga, 2001).

Impactos en la biodiversidad piscícola amazónica tendrá repercusiones importantes a nivel económica y cultural, pues muchas comunidades dependen de la pesca para su sobrevivencia.

## **TOXICIDAD EN ORGANISMOS ACUÁTICOS**

El glifosato altera desde el primer eslabón de la cadena trófica en ecosistemas acuáticos. Por ejemplo, en un estudio hecho sobre el impacto de 23 pesticidas en plantas acuáticas se encontró que las diatomeas y una especie de cianobacteria fueron vulnerables al glifosato. Una de las conclusiones del estudio es que el grado de vulnerabilidad frente al glifosato varía mucho de una especie a otra y que existe un factor de incertidumbre cuando se evalúan pesticidas en ecosistemas acuáticos (Peterson et al, 1994).

Otro estudio encontró que el glifosato puede estimular la eutrofización en ecosistemas acuáticos, ya que algunos productores primarios como las diatomeas utilizan a este herbicida como fuente de fósforo. Una de las preocupaciones generadas por los resultados de esta investigación es que la presencia de glifosato por debajo de los niveles detectables, induce la eutrofización en canales, charcas y otros cuerpos de aguas superficie pequeños, lo que afecta el hábitat de poblaciones de peces (Austin et al, 1991).

Aunque se afirma que el glifosato no se bioacumula, el hecho de que altere la ecología de los productores primarios, está alterando el equilibrio ecológico de toda la comunidad. Este es un problema grave para los ecosistemas tropicales (donde tienen lugar los programas de erradicación de la coca) pues en estas regiones existen abundantes cuerpos de agua.

Uno de los problemas más serios de las formulaciones de glifosato utilizadas para la erradicación de la coca es que algunos de los ingredientes son más tóxicos para la vida acuática que el mismo glifosato. Además, en la combinación que se utiliza, la suma de éstos tienen un efecto aditivo de toxicidad (Bidwell y Gorrie, 1995; Cox, 1995, Abdelghani, 1997; Hartman y Martin, 1984; Folmar, Sander y Julin, 1979).

Hay un estudio comparativo sobre el impacto de herbicidas y surfactantes hecho por Abdelghani (1997), en especies acuáticas.

El estudió la toxicidad aguda de tres herbicidas solos o como mezclas (2,4-D, Garlon-3A y Roundup) y un aditivo químico (el surfactante Syndets) a tres especies de agua dulce: el bagre, ojón o chopa criolla (*Lepomis macrochirus*) y un cangrejo de río.

De los tres herbicidas, el Roundup fue más tóxico para el bagre y el Ojón "bluegill" que el Garlon-3A y el 2,4-D. Los resultados encontrado para el cangrejo del río fueron exactamente los contrarios a los que se encontró en los peces.

El surfactante "Syndets, fue mucho más tóxico que los tres herbicidas para los tres organismos.

Un grupo de investigadores encontró que el glifosato es nocivo en concentraciones sub letales para la carpa *Cyprinus carpio* (Neskovic et al 1996). Entre los efectos reportaron cambios en la actividad enzimática a nivel de plasma, hígado, riñones. Encontraron además alteraciones morfológicas en las branquias, hígado y riñones.

Otros estudios revelan que el glifosato es nocivo también para otras organismos acuáticos. Se ha reportado por ejemplo cambios en el desarrollo y la reproducción del caracol acuático *Pseudosuccinea columella*, cuando este fue expuesto a concentraciones subletales (Tate et al, 1997). Los investigadores encontraron además que cuando el caracol fue expuesto a distintas concentraciones de glifosato, se producía un estímulo en su crecimiento y desarrollo; había un incremento en el número de huevos que tenían más de un embrión embriones. Esto significa que la población de caracoles de esa especie podía incrementarse. Por otra parte, esta especie de caracol es uno de los huéspedes de un parásito del hígado de las ovejas. El estudio concluye que la presencia de glifosato a niveles bajos, puede promover el incremento de este parásito.

Distintas especies de peces tienen distintos grados de vulnerabilidad al glifosato (Wan, 1989). Otros factores que determinan la toxicidad del herbicida incluyen la cantidad de minerales disueltos en el agua (Hartman y Martin, 1984) y la temperatura del agua (Folmar, et al, 1988).

En Colombia se han registrado incidentes en proyectos de piscicultura en lagos y estanques, los cuales se desarrollan con el apoyo de la cooperación internacional y que fueran completamente destruidos por las

fumigaciones con formulaciones de glifosato (Bigwood, 2002).

## **PRESENCIA DE GLIFOSATO EN AGUA POTABLE**

Existen algunos informes que dan cuenta de la presencia de glifosato y AMPA en cuerpos de agua. Se ha reportado la presencia de glifosato en aguas superficiales y subterráneas en Canadá, Dinamarca, Holanda y el Reino Unido.

Un informe de la OMS sobre glifosato y AMPA en agua potable, reporta que se ha encontrado en Estados Unidos fuentes de agua que contenía entre 90 y 1700 µg de glifosato por litro y 2 – 35 µg/litro de AMPA. En aguas corrientes se ha reportado contenidos de entre 35 y 1237 µg/litro de glifosato y hasta 10 µg/litro de AMPA (WHO, 2005)

En Canadá se encontró residuos de glifosato de hasta 5153 µg/litro después de una aplicación aérea sobre lagos. Su degradación dependió de la vegetación presente (WHO, 2005).

En el 2003, el Ministro de Ambiente de Dinamarca prohibió el uso de glifosato en lugares donde puede haber escorrentía del herbicida, con el fin de evitar la contaminación de agua subterránea, que es la fuente de agua potable en ese país con inaceptables niveles de glifosato y AMPA (Legarth y Schmidt, 2003; Kjær et al, 2003).

## **EFFECTOS SOBRE INSECTOS BENÉFICOS**

Varias especies de artrópodos benéficos, entre los que se incluyen insectos, arañas y ácaros, que son depredadoras de plagas agrícolas, son afectadas por la exposición al glifosato.

El uso de glifosato en ambientes agrícolas ha desencadenado el brote de algunas plagas agrícolas, y esto se ha relacionado con la disminución de las poblaciones de especies depredatorias de dichas plagas, que actúan como agentes de control biológico natural. Este es el caso del brote violento del áfido del cereal que tuvo lugar en Estados Unidos al inicio de la década de 1970 (Potts y Vickerman, 1994).

Los impactos pueden producirse por una afectación directa en los individuos expuestos al plaguicida, o por una destrucción de la base de sobrevivencia de la especie.

En el primer caso, una evaluación hecha por la Organización Internacional de Control Biológico sobre los impactos de los plaguicidas en especies benéficas reportó que el 80% de una población de escarabajos depredadores de plagas vegetales murieron cuando fueron expuestos a glifosato. Por otro lado, el 50% de la población de avispa parasitoides, mariquitas, ladybird y ácaros depredadores también murieron luego de la exposición a glifosato (Hassan et al 1988).

En un estudio hecho en Carolina del Norte, Estados Unidos se registró una baja poblacional de escarabajos carabidos tratados con glifosato. La población no se recuperó después de 28 días (Brust, 1990). Resultados similares se encontraron en un estudio hecho en pastos marginales en el Reino Unido tratados con Roundup, donde se encontró una reducción en las poblaciones del escarabajo carábido (Asteraki et al, 1992)

Hay bibliografía científica que da cuenta de la afectación de poblaciones de insectos benéficos debido a cambios en su hábitat.

Este es el caso de un estudio hecho durante tres años consecutivos en Estados Unidos, en un área forestal que 4-5 años antes había sido clareada con Roundup, y luego plantada con plántulas de abeto. Los investigadores encontraron que poblaciones de insectos herbívoros y de invertebrados del suelo habían disminuido significativamente y no se recuperaron durante el período del estudio. Los autores concluyeron que la caída poblacional se debió fundamentalmente al cambio del hábitat de estos organismos (Santillo et al, 1989).

Asteraki et al, (1992 reportan una disminución en el número de arañas en pastos marginales en el tratados con Roundup, posiblemente porque se habían destruido las plantas donde ellas hacían sus telas.

Se ha registrado también alteraciones en los patrones reproductivos en algunas poblaciones de artrópodos benéficos. Chiverton et al (1991) llevaron a cabo un estudio comparativo entre poblaciones de artrópodos rociados y no rociados con herbicidas, en campos de trigo de primavera, en el Reino Unido. Ellos encontraron que escarabajos carábidos hembras que no habían sido tratadas con glifosato, ponían más huevos que aquellas que habían estado expuestas al glifosato. Es posible que la reducción de las especies que les servía como presa al escarabajo carábido produjo una baja en la fertilidad de la especie, lo que significó una reducción en la capacidad de depredación de las plagas agrícolas.

Otro grupo de insectos benéficos afectados por el glifosato incluye las especies polinizadoras.

Una de las quejas que se presentaron con respecto al programa de fumigación con Roundup (más surfactantes), que el gobierno de los Estados Unidos llevó a cabo para eliminar cultivos de amapola en Guatemala, fue que se había destruido la apicultura en las zonas cercanas a las aspersiones. "Aunque el programa de fumigación tuvo un efecto mínimo en los cultivos de amapola, según los campesinos locales, se destruyó la base tradicional de la producción en la región, en particular tomates y abejas." (Freed, 1989; U.S Department of State, 1991).

Como resultado de las presiones de ambientalistas y otros este Programa de Fumigación fue suspendido y ahora el cultivo de amapola en Guatemala está controlado gracias a la erradicación manual. Investigaciones realizadas por la International Organization for Biological Control coinciden con los efectos reportados en Guatemala sobre las abejas; también muestran que existen efectos sobre otros insectos benéficos.

Según estos estudios, se demostró que la exposición de los insectos a una formulación comercial de Roundup (glifosato más surfactantes), provocó tasas de mortalidad mayores al 50% en insectos benéficos, incluyendo avispa parasitoides, crisopos, y mariquitas. El nivel de mortalidad fue aún más alto para un tipo de escarabajo depredador (Hassan et al, 1988). Todos estos juegan un papel importante como agentes de control biológico de plagas para la agricultura, o como bio reguladores naturales.

### **IMPACTO DEL GLIFOSATO EN ANFIBIOS**

La contaminación de las aguas por este herbicida es extraordinariamente letal para los anfibios, según un trabajo de investigación que ha revelado una disminución de la diversidad de anfibios del 70% y una reducción del número total de renacuajos del 86% en charcas contaminadas por Roundup (Relyea, 2005).

En investigaciones conducidas en Australia, la formulación Roundup han demostrado una seria toxicidad en anfibios. En un estudio comisionado en 1995 por el Western Australian Department of Environmental Protection (DEP) y dirigido por el Dr. Joseph Bidwell del Curtin Exotoxicology Program concluyó que Roundup 360 (otra formulación de Roundup que contiene glifosato y surfactantes) puede ser agudamente tóxico a ranas adultas y renacuajos en las tasas de aplicación recomendadas (1.8 to 5.4kg/ha) (Mann y Bidwell, 2004).

Resultados similares se han encontrado en Canadá, donde el glifosato provocó parálisis y hasta la muerte de especies nativas de anfibios (Bruce, 1996)

El herbicida Roundup 360 fue más tóxico a ranas y renacuajos que el grado técnico de glifosato solo. Se asumió que fue el surfactante usado en la formulación del Roundup, y no glifosato en sí, el responsable en el incremento en toxicidad (Bidwell et. al. 1995). Hay que notar que es precisamente el mismo surfactante (POEA) que se encuentra en el Roundup utilizado en Colombia.

Los anfibios son un componente importante de la biodiversidad de esta región amazónica, donde se han registrado los índices más altos de biodiversidad de anfibios por unidad de área en el mundo. Se ha registrado además una alta tasa de extinción de varias especies de anfibios en el Ecuador, y se cree que por efecto de las aspersiones con glifosato este problema se puede agudizar (Coloma, 2005).

### **EFEECTO DEL GLIFOSATO EN REPTILES**

Aunque se han hecho pocos estudios de los impactos de los plaguicidas en general en reptiles, Sparling et. al (2006), encontraron efectos adversos en embriones de la tortuga *Trachemys scripta elegans* cuando estos fueron expuestos a glifosato y sus surfactantes a distintas concentraciones.

### **EFEECTO DEL GLIFOSATO EN MAMÍFEROS**

En estudios de campo, poblaciones de pequeños mamíferos se han visto afectadas a causa del glifosato, por muerte de vegetación que ellos o sus presas utilizan para alimentarse o protegerse.

En el caso de animales herbívoros, la ingestión de vegetación contaminada con glifosato también puede generar efectos negativos. Adicionalmente, los animales pueden entrar en contacto con este herbicida en un ecosistema que ha sido fumigado a través de contacto por la piel, los ojos o por inhalación.

La aplicación de glifosato en ecosistemas boscosos puede cambiar las tasas reproductivas de algunas especies, privilegiando a aquellas que se adaptan a hábitats intervenidos como pastizales, y desplazando a especies que viven en bosques menos intervenidos. Santillo y sus colaboradores (1989) encontraron una menor presencia de pequeños mamíferos en la zona norte-central de Maine, en terrenos "tratados" con glifosato.

Richard y colaboradores (2005) concluyeron que el glifosato actúa como un disruptor de la actividad de la citocromo P450 aromatasa en mamíferos, a unas concentraciones 100 veces más bajas que las que se recomiendan para su uso agrícola. El citocromo juega un papel importante en el metabolismo de sustancias ajenas al organismo, como son fármacos, plaguicidas, etc. muchos de los cuales pueden tener efectos cancerígenos.

Encontraron además que en concentraciones menores a las recomendadas para uso agrícola, el Roundup puede inducir a problemas reproductivos.

Estudios hechos en espermatozoides de conejo (Yousef, et al 1995) encontraron que el tratamiento con el herbicida glifosato redujo el peso corporal, el libido, el volumen de la eyaculación, la concentración y volumen del espermatozoide; se registró además un alto porcentaje de espermatozoides anormales y muertos. Los efectos nocivos continuaron en el período de la recuperación.

## CONCLUSIONES

Aunque existen estudios para evaluar los impactos del glifosato en las especies no objetivo (es decir, las especies que no se quiere eliminar con el herbicida), la mayoría de ellos no consideran importantes aspectos ecológicos, como son los impactos indirectos, acumulativos, a largo plazo del herbicida, ni las reacciones sinérgicas que el plaguicida puede tener en el ecosistema y en las redes tróficas, es decir como el plaguicida incide en el medio ambiente, y a su vez estos cambios afectan al conjunto de comunidades y poblaciones que conforman ese ecosistema.

En muchas evaluaciones se utilizan los esquemas jerárquicos. Se inicia con experimentos simples en unas pocas especies y avanzan a través de una secuencia escalonada de experimentos, que aumentan en complejidad, sofisticación, costo, y duración; dependiendo de los resultados en las pruebas de los niveles más bajos. Los experimentos se inician en el segundo nivel, únicamente si los resultados en la primera indican potenciales efectos adversos.

En muchos casos se utilizan especies que no están presentes en el ecosistema en el que se quiere evaluar los impactos del plaguicida<sup>[4]</sup>.

A pesar de estas limitaciones, es posible hacer una revisión del impacto que tiene el glifosato en organismos distintos a los que se quiere eliminar con el herbicida.

## BIBLIOGRAFÍA .

Abdelghani, A.A. 1997. Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of Roundup, Garlon-3A, 2,4-D, and Syndets surfactant to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), bluegill sunfish (*Lepomis microchirus*), and crawfish (*Procambarus* spp.). *Environmental toxicology and water quality* 12 (3) p. 237-243.

Abdel- Mallek, A.Y., Abdel-Kaden, M.I.A., Shomikier, A.M.A., 1994. Effect of glyphosate on fungal population, respiration and the decay of some organic matter in Egyptian soil. *Microbiological Research* 149: 69 - 73

Austin, A. P. et al. 1991. Impact of an organophosphate herbicide (glyphosate) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 29-35.

Barriga, R. 2001. Peces del Parque Nacional Yasuní. Pp. 139-142 in JP Jorgenson and M Coello Rodriguez (Eds.). *Conservación y desarrollo sostenible del Parque Nacional Yasuní y su área de influencia. Memorias del Seminario-Taller 2001. Ministerio del Ambiente/UNESCO/Wildlife Conservation Society. Editorial SIMBIOE: Quito, Ecuador.*

Bawa, K.S. y Hadley, M. (1990). *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants. Man and Biosphere Series. Volumen 7. UNESCO.*

Bell, F. W., R. A. Lautenschlager, R. G. Wagner, D. G. Pitt, J. W. Hawkins, and K. R. Ride. 1997. Motor-manual, mechanical, and herbicide release affect early successional vegetation in northwestern Ontario. *Forestry Chronicle* 73.

Bezbaruah, B., Saikia, N y Bora, T. 1995. Effect of pesticides on most probable number of soil microbes from tea (*Camellia sinensis*) plantations and uncultivated land enumerated in enrichment media. *India J. of Agric. Sciences* 65(8): 578 – 583.

Bidwell, Joseph-R.; Gorrie, John-R. 1995. Western Australia. Dept. of Environmental Protection. Acute toxicity of a herbicide to selected frog species : final report. Technical series: 79 (9) Western Australian Dept. of Environmental Protection.

Boada, C. 2006. El Ecuador biogeográfico. *Revista Ecuador Tierra incógnita. No. 40. Marzo.*

- Bode, R. Schauer, F y Birnbaum, D. 1986. Comparative studies on the enzymological basis for growth inhibition by glyphosate in some yeast species. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanze* 181: 39-46
- Bruce, P. 1996. Environmental Contaminants and Amphibians in Canada. Pesticides and Behaviour in Tadpoles. FROGLOG Number 16, February
- CCME (1989). Canadian water quality guidelines, Ottawa, Ontario. Environment Canada. Canadian Council of Ministers of the Environment.
- Coloma, L. 2005. Ecuador, Tierra de Sapos y Ranas. *Revista Ecuador Tierra Incognita* No. 33, Enero - Febrero.
- Cox, C. 1995. Glyphosate. 2. Human Exposure and ecological effects. *Journal of pesticide reform: a publication of the Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides*. Winter 15 (4) p. 14-20.
- Cox, Caroline. 1995. Glyphosate, Part 1: Toxicology. En: *Journal of Pesticides Reform:15* (3). Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, Eugene, OR. USA. 13 p.
- D Anieri, P., Leslie, D.M. y McCormack M.L. 1987. Small mammals in glyphosate treated clearcuts in Northern Maine. *Can Field Nat.* 101 (4): 547 – 550.
- Departamento de Salud y Servicios para personas mayores de New Jersey, 2003. Hoja Informativa sobre Substancias Peligrosas: Isopropilamina.
- Descalzo,-R.C.; Punja,-Z.K.; Levesque,-C.A.; Rahe,-J.E. Identification and role of *Pythium* species as glyphosate synergists on bean (*Phaseolus vulgaris*) grown in different soils. *Mycol-res.* [Cambridge : Cambridge University Press], 1989-. Aug 1996. v. 100 (pt.8) p. 971-978
- Dewar,-A.M.; Haylock,-L.A.; May,-M.J.; Beane,-J.; Perry,-R.N. (2000) Glyphosate applied to genetically modified herbicide-tolerant sugar beet and 'volunteer' potatoes reduces populations of potato cyst nematodes and the number and size daughter tubers. *Ann-Appl-Biol.* Warwick: Association of Applied Biologists. 136 (3) p. 179-187.
- Dinham, Barbara. Resistance to glyphosate. En: *Pesticides News* 41: 5, September 1998. The Pesticides Trust. PAN-Europe. London, UK.
- Didhám, R.K. (1997) La Influencia de los Efectos del Borde y de la Fragmentación de Bosques en los Invertebrados de la Hojarasca en Amazonia Central. En *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities* Editado por William F. Laurance y Richárd O. Bierregaard, Jr
- Dinham, Barbara. "Life sciences" take over. En: *Pesticides News* 44: 7, June 1999. The Pesticides Trust. PAN-Europe. London, UK.
- Dindal (ed.) *Soil Biology Guide*. 1990 John Wiley & Sons and *Soil Microbial Ecology*, F. Blaine Metting Jr. (ed.) 1993
- Dunfield KE y Germida J. 2001. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brasica napus*. *Federation of European Microbiology Societies. Microbiology Ecology* 38: 1-9
- Eberbach, P.L. y Douglas, L.A. 1983. Persistence of glyphosate in sandy loam. *Soil Biol. Biochem.* 15(4).
- ENDS Daily, 1999. 6 de Mayo.
- EPA. 1999. Technical Fact Sheets on: Glyphosate. National Primary Drinking Water Regulations. Documento obtenido por Internet.
- Evans, D. D., and M. J. Batty. 1986. Effects of high dietary concentrations of glyphosate. (Roundup) on a species of bird, marsupial and rodent indigenous to Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5: 399-401
- Folmar, L.C., Sander, H.O., and Julin, A.M. 1979. Toxicity of the Herbicide Glyphosate and several of its formulations on fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8: 269-278
- Forestry Commission, 1991. Bulletin 93. Ash dieback. HMSO. London. Reportado en; ENDS Report, 193, 1991.
- Forlani G. Mantelli M, Branzoni M, Nielsen E y Favilli F. 1995. Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant and Soil*. Vol. 176: 243-253. The Netherlands.

- Hartman, WA and Martin, D.B. 1984. Effect of suspended bentonite clay on the acute toxicity of glyphosate to *Daphnia pulex* and *Lemna minor*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 33 pp. 355-361
- Haney,-R.L.; Senseman,-S.A.; Hons,-F.M.; Zuberer,-D.A. 1999. Effect of glyphosate on soil microbial activity. *Proc-S-Weed-Sci-Soc. Raleigh, N.C., etc. Southern Weed Science Society* 52 p. 215.
- Hassan, S.A et al. Results of the fourth joint pesticide testing programme carried Out by the ICBC-WPRS-Working Group "pesticides and beneficial Organisms." *J Appl. Ent* 105 1988, 321-329
- Hutchinson, G.I. Nitrogen Cycle Interactions with Global Change Processes. In Nierthenberg, W.I. (Ed) *Encyclopedia of Environmental Biology. Volume 2* 1995, San Diego, Academic press. Pp. 583-587
- Joensen L. y Semino S. 2004. OMGs en Argentina ¿a qué precio?. Estudio de Caso del Impacto de la Soja Modificada Genéticamente del Grupo de Reflexión Rural de Argentina, publicado por Econexus y The GAIA Foundation. Octubre 2004.
- Johal,-G.S.; Rahe,-J.E. 1984. Effect of soilborne plant-pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. *Phytopathology* 74(8): 950-955.
- Kapos, V., Wandelli, E., Camargo, J.L. y Ganade, G. 1997. Cambios Relacionados al Efecto del Borde en el Ambiente y en las Respuestas de Plantas, como consecuencia de la Fragmentación del Bosque en la Amazonia Central. En *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities* Editado por William F. Laurance y Richard O. Bierregaard, Jr.
- Kenneth Freed "Anti-drug Effort Sow 39. 39.s Bad Blood; Guatemala: Farmers Complain That Legitimate Crops Are Being Damaged by a U.S. Spraying Program Designed to Cut into Heroin Production." *Los Angeles Times*, October 15, 1989, Sunday, Home Edition 39. 39.
- King CA, Purcell LC y Vories ED. 2001. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. *Agronomy Journal*, 93: 179-186.
- Kjær, J. Ullum, M. Olsen, P. Sjelborg, P. Helweg, A. Mogensen, B. Plauborg, P. Grant, R. Fomsgaard I. Y Brüsck W. 2003. The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme (PLAP). Monitoring results May 1999 - June 2002 . Third report
- Kremer RJ. Y Donald, P. 2003 Herbicide impact on *Fusarium* spp. And soybean cyst nematode in glyphosate tolerant soybean. *American Society of Agronomy*, (573) 882-2716
- Legarth Schmidt, A. 2003. Poisonous Spray on a Course Towards Drinking Water. Politken, Denmark.
- Levesque,-C.A.; Rahe,-J.E.; Eaves,-D.M. The effect of soil heat treatment and microflora on the efficacy of glyphosate in seedlings. *Weed-Res. Oxford Blackwell Scientific Publications.* Oct 1992. v. 32 (5) p. 363-373.
- Levesque,-C.A.; Rahe,-J.E.; Eaves,-D.M. Fungal colonization of glyphosate-treated seedlings using a new root plating technique. *Mycol-Res. Cambridge - Cambridge University Press.* Mar 1993. v. 97 (pt.3) p. 299-306.
- Levesque,-C.A.; Beckenbach,-K.; Baillie,-D.L.; Rahe,-J.E. Pathogenicity and DNA restriction fragment length polymorphisms of isolates of *Pythium* spp. from glyphosate-treated seedlings. *Mycol-Res. Cambridge : Cambridge University Press.* Mar 1993. v. 97 (pt.3) p. 307-312.
- Marassas, W.F.O, Nelson, P.E., and Tousson, T.A. *Toxicogenic Fusarium species: Identity and Mycotoxicology* Pennsylvania State University press, 1984
- Mann, R.M., Bidwell, J.R. 2004. The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of Southwestern Australian Frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* Volume 36, Number 2 / February, 1999.
- Mackinnon, D. S., and B. Freedman. 1993. Effects of silvicultural use of the herbicide glyphosate on breeding birds of regenerating clearcuts in Nova Scotia, Canada. *Journal of Applied Ecology* 30: 395-406.
- Mekwatanakarn, P y Silvassithamparam, K 1987. Effect of certain herbicides on soil microbial populations and their influence on saprophytic groth in soil and pathogenicity of take-all fungus. *Biol. Fétil. Soils* 5: 75 - 180.
- Messina J.P. y Delamater, P.L. 2006. Defoliation and the war on drugs in Putumayo, Colombia. *International Journal of Remote Sensing.* Volume 27, Number 1 / 10 January 2006 pp. 121 -128.



- Nivia, E. 2001 . Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas que contienen glifosato. Boletín electrónico de la UITA
- Panus, D.P. (1980) Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae Affect Lowland Tropical Rain Forest Plant Growth. *Ecology*, Vol. 61, No. 1 (Feb., 1980), pp. 151-162
- Rahe,-J.E.; Levesque,-C.A.; Johal,-G.S. Synergistic role of soil fungi in the herbicidal efficacy of glyphosate. *A-C-S-Symp-Ser-Am-Chem-Soc. Washington, D.C. : The Society. 1990. (439) p. 260-275*
- Relyea, R. 2005. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. *Journal Ecological Applications*.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour,N., Seralini, G-E. 2005. Differential Effects Of Glyphosate And Roundup On Human Placental Cells And Aromatase. *Environmental Health Perspectives, June*.
- Richie, D.C. Harestad, A.S. y Archibald, R. 1987. Glyphosae treatment and deer mice in clearcut and forest. *Northwest Sci. 61(3), 199 - 202.*
- Sanderson,-J.B.; MacLeod,-J.A.; Kimpinski,-J. 1999. Glyphosate application and timing of tillage of red clover affects potato response to N, soil N profile, and root and soil nematodes. *Can-j-soil-sci. Ottawa. 79 (1) p. 65-72.*
- Sanogo,-S.; Yang,-X.B.; Scherm,-H. 2000. Effects of herbicides on *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean. *Phytopathology. St. Paul, Minn. American Phytopathological Society, 1911- v. 90 (1) p. 57-66.*
- Santillo, D. J., P. W. Brown, and D. M. Leslie, Jr. 1989. Response of songbirds to glyphosate-induced habitat changes on clearcuts. *J. Wildl. Manage. 53:64-71.*
- Santillo, D. J., P. W. Brown, and D. M. Leslie, Jr. 1989. Response of songbirds to glyphosate-induced habitat changes on clearcuts. *J. Wildl. Manage. 53:64-71*
- Santos, A. Y Flores, M. 1995. Effects of glyphosate on nitrogen-fixing of free living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology 20(6): 349 – 352.*
- Servizi, J.A., Gordon, r.W. and Martens, D.W. 1987. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia* and trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol. 33: 355 – 361.*
- Smiley, R.W. 1992. Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* root rot, growth, and yield of barley. *Plant Dis, 76: 937 – 942.*
- Sparling DW, Matson C, Bickham J, Doelling-Brown P. 2006. Toxicity of glyphosate as Glypro and LI700 to red-eared slider (*trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. *Environmental toxicology and chemistry: Oct;25(10):2768-74.*
- Springett, JA and Gray, R.A.J. Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in laboratory culture. *Soil. Biol. Biochem, 24 (12) 1992: pp. 1739-1744.*
- Stratton,-G.W.; Stewart,-K.E. Glyphosate effects on microbial biomass in a coniferous forest soil. *Environ-Toxicol-Water-Qual. New York, N.Y. : John Wiley & Sons. Aug 1992. v. 7 (3) p. 223-236.*
- Stephen M. Turton y Freiburge, J. 1997. Efecto del borde y del Aspecto del borde en el Microclima de un Bosque Fragmentado en Atherton, Tableland, Nor-Este de Australia. En *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities* Editado por William F. Laurance y Richard O. Bierregaard, Jr.
- U.S. Department of State cable from Guatemala to Washington, DC: 1991GUATEM00643
- Wan, M.T. Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products. *Bulletin of environmental contamination and toxicology. Sept 1989. v. 43 (3) p. 378-*
- Wan, M.T. Acute toxicity to juvenile Pacific Northwest salmonids of Basacid Blue NB755 and its mixture with formulated products of 2,4-D, glyphosate, and triclopyr. *Sept 1991. v. 47 (3) Bulletin of environmental contamination and toxicology. p. 471-478.*
- Wan,-M.T.; Rahe,-J.E.; Watts,-R.G. A new technique for determining the sublethal toxicity of pesticides to the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Environ-Toxicol-Chem. Pensacola, Fla. : SETAC Press. July 1998. v. 17 (7) p. 1421-1428.*

Wan, Michael T., Rahe, James E., and Watts, Ronald G. A New Technique for Determining the Sublethal Toxicity of pesticides to the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus GLOMUS INTRARADICES *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, No. 7. 1998 pp 1421-1428

Wang, Y.S. 1994. Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth. *Water, Air, and Soil Pollution* Apr. 74 (3/4) Welten, R., et al. (2000), "Ecotoxicity of contaminated suspended solids for filter feeders (*Daphnia magna*)."  
*Archives of Env. Contam. And Tox.* 39 (3): 315-323.

World Health Organization, 2005. Glyphosate and AMPA in drinking-water. WHO/WSH/03.04/97

Yousef MI, Salem MH, Ibrahim HZ, Helmi S, Seehy MA, Bertheussen K (1995). Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environ. Sci. Health B* 30:513-34.

Zablotowicz, R.M. y Reddy, K. N. 2004. Impact of Glyphosate on the Bradyrhizobium japonicum Symbiosis with Glyphosate-Resistant Transgenic Soybean: A Mini review. *J. Environ. Qual.* 33:825–831.

## NOTAS

[1] La isopropilamina, está en la lista de sustancias peligrosas y reglamentada por la (Occupational Safety and Health Administration). Es destructiva a los tejidos de la membrana mucosa y vías respiratorias superiores, e puede irritar a los pulmones (Departamento de Salud y Servicios para personas mayores de New Jersey, 2003).

[2] POEA es 30 veces más tóxico para peces que el glifosato (Servizi et al, 1995). Causa daño gastrointestinal y al sistema nervioso central, problemas respiratorios y destrucción de glóbulos rojos en humanos. POEA está contaminado con 1-4 dioxano, el cual ha causado cáncer en animales y daño a hígado y riñones en humanos (Nivia, 2001).

## **Anexo II, Documento 2° .**

### **Nuevos herbicidas en los cultivos transgénicos ( GRAIN ) , 15-10-07.**

--Las grandes corporaciones agroindustriales se han lanzado a una nueva carrera para ampliar sus ganancias a partir del terreno que ganaron en los últimos diez años imponiendo con éxito monocultivos resistentes a herbicidas a lo largo y ancho de aquellos países que abrieron sus fronteras a los transgénicos.

Así tenemos a Monsanto, BASF y Dow que compiten (y al mismo tiempo colaboran) en la investigación de nuevos cultivos resistentes a herbicidas que ya están llegando a los campos o llegarán en los próximos cinco años.

Por detrás de la supuesta búsqueda de nuevos cultivos que suplanten a los cultivos resistentes al glifosato, obsoletos ante el obvio surgimiento de malezas resistentes al mismo, se esconde la búsqueda del control de un inmenso mercado de productos agrícolas primarios y agrotóxicos del que ninguna empresa quiere perder tajada. Hoy parece ser que ninguna de las corporaciones se acuerda de la seguridad con que diez años atrás afirmaban que nunca se producirían malezas resistentes al glifosato.

La venta del paquete tecnológico semilla-agrotóxico (protegido por la correspondiente patente que garantice el cobro de las regalías) es la ecuación perfecta para sostener un poder corporativo que ha crecido en las últimas décadas de una forma que no tiene precedentes (1).

Por supuesto, quienes pagarán los costos de la continuidad de este modelo son los campesinos, los consumidores y el ambiente, que verán cómo a la lluvia de glifosato que inunda millones de hectáreas de monocultivos de soja, algodón, maíz y cáñola ahora se suman otros agrotóxicos que completan el menú corporativo de la muerte: imidazolinonas, dicamba y 2,4 D.

Los "nuevos" transgénicos y otras nuevas tecnologías desnudan además que el único objetivo en el desarrollo de estas semillas es y será el control corporativo de la agricultura, las semillas y los agricultores —sin importar por supuesto las consecuencias que sobre la salud y el ambiente produce el brutal envenenamiento planetario.

Veamos a continuación los "avances" que las grandes corporaciones se traen entre manos:

#### **Los cultivos Clearfield .**

En este caso la empresa BASF sale al cruce de las críticas que desde amplios sectores de la sociedad se hacen a los transgénicos para ofrecer más de lo mismo: un cultivo resistente a herbicidas desarrollado por otra tecnología diferente a la transgénesis al que han denominado Clearfield ("campo claro", "campo desnudo").

Esta tecnología consiste en el desarrollo de un cultivo resistente a un herbicida sin la introducción de un gen de una especie distinta y por esa razón es promocionada por BASF alegando que su semilla no es transgénica. El cultivo se formula a partir de un supuesto mejoramiento tradicional que en algunos casos incluye la utilización de mutagénesis químicamente inducida.

Sin embargo y tal como lo plantea claramente RAP-AL Uruguay (2) los cultivos Clearfield "implican prácticamente los mismos peligros ambientales que los cultivos transgénicos, además de los característicos de todo monocultivo a gran escala". Tal como ya lo hemos planteado en otro documento de GRAIN (3) "la mutagénesis produce plantas con todo tipo de cambios morfológicos y una multiplicidad de cambios genéticos, pero como esta tecnología no introduce nuevos genes escapa a regulaciones y a convenciones internacionales".

Todos los cultivos Clearfield son resistentes a herbicidas del grupo de las imidazolinonas; BASF proporciona el herbicida o mezcla de herbicidas correspondiente a la semilla adquirida dentro del mismo paquete tecnológico. BASF ha desarrollado maíz, arroz y girasol Clearfield y los herbicidas son mezclas en distintos porcentajes de herbicidas del grupo de las imidazolinonas. Por ejemplo el producto OnDuty es una mezcla de 52.5% de imizapic y 17.5% de imizapir.

Los herbicidas de este grupo son considerados de "baja toxicidad" para humanos y animales, aunque la misma empresa los considera "ligeramente tóxico para las abejas". Y por supuesto si uno lee detenidamente el marbete de los herbicidas de este grupo (4) se encuentran las advertencias que demuestran que su baja toxicidad no va más allá de las declaraciones propagandísticas de la empresa. Por otro lado algo que caracteriza a este grupo de herbicidas es la persistencia en los terrenos, por lo que la contaminación de los mismos queda asegurada por largos periodos.

#### **Cultivos resistentes a dicamba.**

Durante los últimos meses el vicepresidente de Monsanto, Robert Fraley, ha estado reiteradas veces en Argentina anunciando los nuevos productos para la próxima década de la mayor corporación de los transgénicos del planeta. Entre los más destacados se cuenta la soja resistente al dicamba (5) que promete sustituir a la soja RR cuando la misma se vuelva obsoleta ante el avance de las malezas resistentes al glifosato.

El anuncio era también una alerta sobre el hecho de que cuando la soja resistente al dicamba salga al mercado Monsanto retirará toda la soja resistente al glifosato dejando únicamente la nueva soja.

Cada exposición de Fraley concluyó con una demanda suya por seguridad jurídica, que en términos reales significa exigir que Argentina modifique su legislación para permitir que Monsanto tenga mayor control sobre las semillas comercializadas en el país y que se termine con el derecho al uso propio que consagra la actual legislación. Esta exigencia se ve ahora reforzada con el anuncio de Monsanto de invertir en Brasil para desarrollar una nueva soja

transgénica que no se comercializará en Argentina ni Uruguay “debido a que Monsanto no firmó aún con esos países acuerdos sobre la propiedad intelectual” (6).

### **Cultivos resistentes a 2,4 D.**

El anuncio más reciente es de Dow Agrosiences, que a fines de agosto prometió que para 2012 tendría en el mercado un maíz resistente al herbicida 2,4 D (2,4 diclorofenoxiacético) conjuntamente con la característica Bt (7). Partiendo de asumir el surgimiento de malezas resistentes al glifosato, Dow sale al mercado a ofrecernos esta “alternativa”: regar nuestros campos con el tristemente célebre componente del Agente Naranja.

El 2,4 D forma parte de la historia del horror de la humanidad porque fue usado por el ejército de Estados Unidos en la guerra de Vietnam provocando muerte y gravísimos problemas de salud a millones de personas como componente del Agente Naranja.

Si bien los gravísimos problemas causados en Vietnam son atribuidos a la presencia “accidental” como subproducto de dioxinas en el Agente Naranja, el 2,4D ha quedado para siempre ligado a las malformaciones y cánceres que provocó en las poblaciones afectadas. Siempre se debe tener presente que la fabricación del 2,4D está inevitablemente ligada a la producción de dioxinas.

El efecto tóxico del 2,4D no se debe exclusivamente a sus “impurezas” ya que en su empleo como herbicida en los arrozales se le vincula claramente a problemas de salud tales como diabetes transitoria, ataques a hígado y riñones, desequilibrio hormonal, fiebres intermitentes, abortos, hipertensión y, principalmente, cáncer de todo tipo (8). De cualquier manera es muy claro que las “impurezas” pueden aparecer nuevamente en los productos comerciales; mucho más cuando su fabricación en las últimas décadas se ha transferido a los países del sur (Argentina es el segundo productor mundial).

#### **Los herbicidas en detalle**

*Imidazolinonas: son de aplicación temprana pre y post emergente y su mecanismo de acción se basa en inhibir la enzima acetohidroxisintetasa.*

*Dicamba: es el nombre del compuesto ácido 3,6-dicloro-2-metoxi benzoico que es usado para controlar malezas de hojas anchas anuales y perennes. Su mecanismo de acción se basa en actuar como hormona de crecimiento en plantas. También es considerado de “baja toxicidad” pero de alta residualidad en los terrenos donde se aplica.*

*El 2,4 D es también un herbicida de tipo hormonal y se le considera “moderadamente tóxico”. Se utiliza en el control de malezas de hoja ancha. Su permanencia en los suelos es alta y es muy fácil que contamine cursos de agua adyacentes a las zonas de aplicación.*

#### **Las nuevas alianzas corporativas**

Por si no fuera suficiente lo que cada una de estas corporaciones se trae por separado, hay varias alianzas entre ellas para el desarrollo de otros productos. El panorama de lo que se traen entre manos es escalofriante.

Monsanto y Syngenta anunciaron hace unos meses (9) una alianza para el desarrollo de cultivos de alto rendimiento resistentes a condiciones ambientales adversas tales como la sequía. No se puede desconocer que Syngenta es uno de los mayores productores mundiales de dicamba y que seguramente la resistencia al mismo estará incluida en los nuevos productos que desarrollen.

Dupont y Nidera, lanzaron hace pocos días el Finesse-sts: se le agregó a la soja resistente a glifosato un gen de resistencia a sulfoniureas, que habían quedado de lado durante la era del glifosato (10). Parece que ahora éstas vuelven a ser útiles y se pueden sumar al cóctel de agrotóxicos que se aplica a la soja.

Finalmente Dow Chemical, la mayor empresa química de Estados Unidos, y la gigante biotecnológica Monsanto anunciaron días atrás que planean crear conjuntamente la siguiente generación de semillas de maíz genéticamente modificadas. (11) Estas semillas SmartStax, que esperan introducir al mercado hacia el 2010, combinarán la resistencia a nada menos que ocho herbicidas diferentes con genes de protección contra insectos.

Esta última noticia no precisa de ningún comentario ya que las dimensiones de lo que plantean hablan por sí solas.

#### **Los impactos y las verdaderas resistencias.**

El paquete tecnológico de semillas resistentes a herbicidas inaugurado con la soja RR ya ha dado ampliamente las pruebas de su impacto social, ambiental y sanitario. La expansión de los monocultivos, el incremento del uso de agrotóxicos, el surgimiento de nuevas malezas resistentes, la destrucción de áreas naturales por el avance de la frontera agrícola, la pérdida y desplazamiento de los cultivos locales y las semillas campesinas, el desplazamiento de campesinos de las zonas rurales, el avance de los transgénicos y el incremento del control de la agricultura por las grandes corporaciones agroalimentarias son sólo los títulos de un drama que día a día va profundizando la crisis socio ambiental en aquellos territorios que han sufrido la invasión de las agroindustrias (12).

En este caso lo que queda muy claro es que todos estos productos multiplicarán de manera sustancial la aplicación de agrotóxicos en todas las regiones donde se imponga su cultivo. El ejemplo de Argentina, donde se pasó de usar un millón de litros de glifosato en la temporada 1991/1992 a 160 millones de litros en los años 2004/2005 en su forma comercial (12) es sólo una muestra de lo que estas empresas planifican para el futuro. La capacidad de estos herbicidas de permanecer por largo tiempo en los suelos agrava sobremanera los problemas que causarán.

Parece ser que la experiencia reciente con el impacto ya ampliamente demostrado de agrotóxicos como el DDT o el mismo 2,4D no ha servido para que se detengan las insaciables manos asesinas agroindustriales.

Por suerte, hoy son millones las personas conscientes que han decidido tomar cartas en el asunto para detener la “primavera silenciosa”. Y por supuesto son las organizaciones campesinas —las que conviven día a día con los impactos de este modelo de agricultura— quienes están al frente de las luchas contra el modelo agroindustrial. La lucha contra las fumigaciones, la resistencia a los monocultivos y los desiertos verdes, el rechazo a los derechos de propiedad intelectual y sobre la vida, la experimentación y puesta en práctica de modelos agroecológicos y sobre todo la formulación y construcción de la soberanía alimentaria de los pueblos, son las herramientas más sólidas con las que nuestros pueblos cuentan hoy para defenderse de este embate.

*Notas:*

1. Silvia Ribeiro, “Los dueños del planeta: corporaciones”, <http://www.jornada.unam.mx/2005/12/31/019a1eco.php> , 31 de diciembre de 2005
2. RAP-AL, “Cultivos no-transgénicos resistentes a herbicidas. Una nueva ‘solución’ de la industria: tecnología Clearfield”, 31 de diciembre de 2005, <http://tinyurl.com/2v3gtd> (PDF).
3. GRAIN, “Swapping Striga for patents”, Seedling, octubre 2006, <http://www.grain.org/seedling/?id=440>
4. BASF, “El sistema de producción Clearfield”, <http://www.agro.BASF.com.ar/clearfield/clearfield.htm>
5. Fabiana Monti, “La biotecnología dominó la siembra de la última década. El número dos de Monsanto adelantó los eventos de segunda generación”, 26 de agosto de 2007, <http://tinyurl.com/36rlar>
6. AFP, Sao Paulo, Brasil, “Monsanto invierte \$ 28 millones en nueva soja transgénica en Brasil”, 5 de septiembre de 2007, <http://tinyurl.com/32doug>
7. “Dow AgroSciences prometió un maíz Bt con tolerancia a 2,4-D para el año 2012”, 28 de agosto de 2007, <http://tinyurl.com/324lxw>
8. Sebastião Pinheiro, “El infierno del 2,4-D. De la guerra de Vietnam a la agricultura de guerra”, RAP-AL, 29 de marzo de 2004, <http://webs.chasque.net/~rapaluy1/24D/24D.htm>
9. Boletín de prensa: “BASF and Monsanto Announce r&d and Commercialization Collaboration Agreement in Plant Biotechnology”, 21 de marzo de 2007, <http://monsanto.mediaroom.com/index.php?s=43&item=470>
10. Héctor Huergo, “Llega una nueva ola de tecnología para el agro”, El país, 13 de septiembre de 2007, <http://www.clarin.com/diario/2007/09/13/elpais/p-01701.htm>
11. Reuters, “Dow Chemical y Monsanto firman acuerdo para nuevas semillas maíz”, 14 de septiembre de 2007, <http://tinyurl.com/3cw2a3>
12. Miguel Altieri y Walter Pengue, “La soja transgénica en América Latina: una maquinaria de hambre, deforestación y devastación socioecológica”, 21 de abril de 2006, <http://www.biodiversidadla.org/content/view/full/23297>

--

## Anexo II , Documento 3°.

**Glifosato y Fusarium.** Jeremy Bigwood . CounterPunch.

Cunde la alarma entre científicos por la relación entre la aplicación de un herbicida común a las cosechas de alimentos y la resultante proliferación de hongos en la cosecha. Se señala que el popular producto de Monsanto *Roundup*, que contiene un producto químico llamado glifosato aumenta el tamaño de las colonias del hongo *Fusarium*, un género de mohos a menudo muy tóxicos que ocurren naturalmente en los suelos naturales y que invaden ocasionalmente los cultivos, pero que generalmente es controlado por otros microbios. Si esas afirmaciones corresponden a la realidad, no sólo cuestionan el principal herbicida utilizado en el mundo, sino que también ponen en peligro la aceptación mundial de la línea bandera de los cultivos genéticamente modificados de Monsanto "*Roundup Ready*".

"Parece que el trigo tratado con glifosato sufre niveles más elevados de una enfermedad tóxica de hongos conocida como *Fusarium head blight* que los campos de trigo a los que no se ha aplicado glifosato" dijo la científica Myriam Fernández del Semiarid Prairie Agricultural Research Centre en Swift Current, Saskatchewan, en una reciente entrevista.

Fernández agregó: "Aún no hemos terminado con el análisis de cuatro años de datos o escrito el estudio". Aunque la investigación de Fernández recientemente llegó a los titulares en todo Canadá, no fue la primera en discutir la relación entre las fórmulas de herbicidas que contienen glifosato y el refuerzo de hongos potencialmente tóxicos, pero fue la primera en informar sobre la posibilidad de daños potencialmente tóxicos a las cosechas, causados en el trigo y en la cebada, dos de los cultivos más importantes de Canadá.

Según el doctor Harvey Glick, jefe de Asuntos Científicos de Monsanto, que mantiene su actitud crítica: "Parece ser que la Dra. Fernández hizo un estudio sobre el terreno basado en los niveles de *Fusarium* y luego sobre los factores que podrían estar relacionados. Así que, por lo que veo, no fue de causas y efectos. Es sólo que vieron que en su área de estudio que algunos campos tenían niveles más elevados de *Fusarium*, por la razón que sea, y luego consideraron una lista de factores que podrían tener que ver y que uno de ellos fue que en esos campos se utilizó *Roundup* el año anterior.

Puede ser así, pero, durante las últimas dos décadas, varios científicos de Nueva Zelanda a África han notado e investigado la relación entre el glifosato y *Fusarium* a través de experimentos en pequeña escala en la relativa oscuridad de sus laboratorios y que han informado sobre los resultados de su trabajo a través del mundo oculto de las publicaciones académicas. El resultado de todo este trabajo, es "sólo menos de 50 trabajos científicos", dice el doctor Robert Kremer, un especialista en suelos de la Universidad de Missouri. Este conjunto de trabajos muestra un aumento en *Fusarium* u otros microbios después de la aplicación de glifosato.

El Dr. Glick de Monsanto no está de acuerdo: "*Roundup* tiene más de 30 años y los científicos han estado estudiando todos los aspectos de su uso por lo menos durante ese período. Así que existe una tremenda cantidad de información. Y por eso existe un nivel tan elevado de confianza en que el uso de *Roundup*, basado en todo este trabajo previo, no tiene ningún impacto negativo en los microbios del suelo... Y gran parte de ese material ha sido publicado".

La continua investigación del Dr. Kremer trata del efecto de la relación entre el glifosato y *Fusarium* sobre la soya, y también sobre la soya "*Roundup Ready*". Monsanto ha estado produciendo una serie de semillas genéticamente modificadas "*Roundup Ready*" para varios cultivos incluyendo algodón, soya, trigo y maíz, para ser utilizadas exclusivamente con su exitoso herbicida de glifosato, *Roundup*. Los cultivos "*Roundup Ready*" no son afectados por el herbicida *Roundup*, que destruirá todas las plantas competidoras en el mismo terreno como ser las malezas. Como son genéticamente modificados, no han sido fácilmente aceptados en numerosos países fuera de EE.UU., y están prohibidos en Canadá y Europa.

El Dr. Kremer estableció en sus experimentos con soya "*Roundup Ready*" que "el glifosato parece estimular el *Fusarium* en el área de las raíces de las plantas", en tal grado que considera que el aumento de los niveles de *Fusarium* es "el modo secundario de acción del glifosato" Aunque encontró colonias de *Fusarium* en las raíces de sus plantas, que podrían reducir potencialmente la cosecha, no las encontró en la soya cosechada. A pesar de ello, expresó su preocupación por las consecuencias de esa acumulación de *Fusarium* en el suelo.

El Dr. Kremer también señaló: "No vimos el refuerzo del *Fusarium* cuando se utilizaron otros herbicidas". Sin embargo, en el caso de cultivos de "*Roundup Ready*", *Roundup* tiene que ser utilizado exclusivamente como herbicida, o en combinación con otros productos químicos. La utilización exclusiva de otros herbicidas constituiría una violación de contrato.

Por lo tanto, si *Roundup* aumenta los niveles de Fusarium, los cultivos de "*Roundup Ready*" que utilizan *Roundup* como herbicida, podrían convertirse en desastres potenciales, aumentando los niveles de Fusarium en el suelo a niveles tan críticos que podría producir una epidemia y transmitirse de un campo a otro en un área considerable.

En un reciente artículo titulado "Algodón GM culpado por la enfermedad", *Farm Weekly*, una publicación australiana, predijo que "hasta un 90 por ciento de la zona aldonera podría ser inundada en la próxima década por Fusarium, el patógeno marchitador transmitido por el suelo" debido al algodón "*Roundup Ready*" (Algodón RR).

La contaminación de cereales por Fusarium, tales como el Fusarium Head Blight (FHB) en el trigo y la cebada que la Dra. Fernández está estudiando en Saskatchewan ha causado serias pérdidas de cultivos. Aproximadamente un quinto de la cosecha de trigo en Europa es perdido cada año en Europa por el FHB, y en Michigan, se estimó que entre un 30 y un 40% de los cultivos fueron destruidos durante 2002 por la plaga. Cuando el moho pasa sin ser detectado a la cadena alimenticia, las epidemias de Fusarium pueden tener efectos aún peores: una epidemia de Fusarium en cereales fue considerada responsable por miles de muertes en Rusia durante los años 40 y más recientemente en 2001, causó una serie de efectos mortales al nacer entre mexicano-estadounidenses consumidores de tortillas en Brownsville, Texas.

Cuando es cultivado en platos Petri, Fusarium puede mostrar diversos colores, que varían a menudo de color naranja a salmón, y tiene diferente apariencia en diferentes cereales y en diferentes etapas de su ciclo de vida. En el trigo y en el centeno puede aparecer con un color blanco terroso; en el centeno como un óxido negro y en la avena puede verse cerca de negro o de un color naranja rojizo. Pequeñas cantidades de contaminación de granos son invisibles al ojo humano, y hay que realizar tests químicos para detectarla. Ya que esos tests son pagados por el agricultor, hay pequeñas cantidades que llegan continuamente a los productos alimenticios comerciales. A niveles más elevados puede convertirse en un problema serio.

El hongo Fusarium puede producir una serie de toxinas que no son destruidas en el proceso de cocción, tales como vomitoxina que, como su nombre sugiere, causa generalmente vómitos y no la muerte, y compuestos más letales que incluyen la fumonisina, que puede causar cáncer y defectos al nacer y el muy mortífero agente de guerra química, la fusariotoxina, llamada más a menudo toxina T2.

Durante 2000, el Congreso de EE.UU. planeó la utilización del hongo Fusarium como un agente de control biológico para destruir cultivos de coca en Colombia y otro hongo para destruir adormideras en Afganistán, pero esos planes fueron rechazados por el presidente Clinton que estaba preocupado de que el uso unilateral de un agente biológico sería percibido por el resto del mundo como guerra biológica. Las naciones andinas, incluyendo Colombia, donde iba a ser utilizado en la guerra de la droga contra los cultivos de coca prohibieron su uso en toda la región. Sanho Tree, director del Instituto de Estudios de Política del Proyecto de Política de la Droga comentó sobre el uso de un producto químico que produce un microorganismo prohibido: "EE.UU. ha suministrado decenas de miles de galones de *Roundup* al gobierno colombiano para su uso en la fumigación aérea de cultivos de coca. Hemos estado utilizando una flota de aviones de fumigación para lanzar cantidades sin precedentes de glifosato sobre cientos de miles de acres en uno de los ecosistemas más delicados y biodiversos del mundo. Este fútil esfuerzo ha hecho poco por reducir la oferta de cocaína en nuestras calles, pero ahora vemos que un posible efecto secundario de esta campaña podría ser el comienzo de una epidemia de Fusarium en la cuenca del Amazonas. La guerra de la droga ha tratado en vano que la cocaína no llegue a las narices de la gente, pero podría, en su lugar, abrasar los pulmones de la tierra".

Por el vínculo entre el glifosato y el Fusarium, la Unión Nacional de Agricultores de Canadá ya se está oponiendo a la introducción del trigo "*Roundup Ready*" genéticamente modificado, y este tema no muestra indicios de desaparecer. Sólo el tiempo dirá si Monsanto podrá "arreglar" los problemas de los cultivos de "*Roundup Ready*" con más ingeniería genética -esta vez para controlar el Fusarium- o si su principal herbicida y su línea bandera de cultivos de "*Roundup Ready*" serán rechazados por los agricultores de nuestros días.

Jeremy Bigwood es un escritor e investigador independiente Una versión de este artículo fue publicada por IPS.

-----

PD/ Nota al día de hoy, 28 de enero de 2008, las nuevas investigaciones confirman el contenido de el anterior informe. También se han iniciado estudios para investigar la posible responsabilidad del hongo Fusarium en la pérdida casi total de los cultivos frutales de nísperos en los Guajares (montaña granadina) producida a raíz de la introducción masiva de herbicidas de glifosato o glufosinato para "escarda química" de los cultivos.

## Anexo II , Documento 4º.- Manifiesto de enero de 2008.

### -Investigadores y representantes de la sociedad civil firman contra los transgénicos

TRANSGÉNICOS 16 de enero

Democracia, precaución y medio ambiente, p2

Amigos de la Tierra, COAG, Ecologistas en Acción y Greenpeace, con la colaboración de Científicos por el Medio Ambiente (CIMA) e investigadores, han presentado la [Declaración de personalidades y organizaciones de la sociedad civil sobre las aplicaciones de la biotecnología en la modificación genética de plantas, ante la amenaza que representan para la agricultura y la sostenibilidad](#). [Democracia, precaución y medio ambiente](#).

Este documento cuenta con el apoyo de una gran representación de la sociedad, que incluye investigadores, docentes universitarios, organizaciones profesionales agrarias, asociaciones ecologistas, de consumidores, de productores de agricultura ecológica, ONG de desarrollo y entidades privadas entre otras.

Frente a las promesas de la industria de los transgénicos, esta Declaración denuncia los peligros e impactos de su introducción en el medio ambiente y en nuestros platos. El amplio apoyo social evidencia que los transgénicos son una cuestión que afecta al conjunto de la sociedad. La clase científica es una parte importante del debate y la sociedad en su conjunto es además quien debe tomar las decisiones que afectan a la agricultura, la alimentación, las aplicaciones de los transgénicos y el derecho a producir y consumir en libertad.

Éste es un momento clave en el debate sobre los transgénicos. Mientras Francia se suma a los países de la UE que prohíben el cultivo de maíz transgénico, basándose en una serie de informes científicos que alertan sobre los impactos ambientales sobre la flora y la fauna y las incertidumbres sanitarias, España sigue siendo el principal productor de maíz transgénico, con más de 75.000 hectáreas cultivadas en 2007.

Los elementos científicos que han originado la decisión del Gobierno galo muestran una serie de consecuencias de los maíces tipo Bt (entre ellos el que se cultiva en España, el MON 810) sobre el medio ambiente y la salud, como la imposibilidad de evitar la contaminación a otros agricultores, la generación de resistencias en plagas y los efectos tóxicos sobre varios tipos de organismos presentes en los ecosistemas, el cambio en la caracterización molecular (el gen que se comercializa no es el que se aprobó en 1998, ha variado, y por lo tanto muchos efectos sobre el medio ambiente se desconocen), los impactos sobre los polinizadores, la toxicidad a largo plazo sobre seres humanos, la persistencia de las toxinas producidas, etc.

Recientemente en Bruselas, el Comisario Europeo de Medio Ambiente Stavros Dimas ha propuesto la prohibición de dos maíces transgénicos por los riesgos que suponen para el medio ambiente, basándose en las evidencias de los potenciales daños ambientales. Ya durante la disputa comercial con Estados Unidos ante la Organización Mundial del Comercio (OMC) sobre productos transgénicos, la propia UE argumentó que los cultivos Bt no deberían ser hoy por hoy cultivados por la falta de conocimientos sobre sus impactos ambientales en el largo plazo.

Las organizaciones promotoras de esta Declaración esperan que sirva para impulsar un debate fundamental como es el de la introducción de los transgénicos, que el Gobierno tome nota de la abrumadora oposición social frente a su imposición en la agricultura y la alimentación y que el Ministerio de Agricultura reconsidere su apuesta transgénica y oriente la agricultura española hacia soluciones ambiental y socialmente sostenibles.

### -Democracia, precaución y medio ambiente

#### **Declaración de personalidades y organizaciones de la sociedad civil sobre las aplicaciones de la biotecnología en la modificación genética de plantas, ante la amenaza que representan para la agricultura y la sostenibilidad.**

Los organismos modificados genéticamente (OMG) se obtienen mediante la ingeniería genética, que permite crear plantas, animales y microorganismos manipulando sus genes. En los últimos años, esta técnica se ha utilizado para intentar introducir nuevas características en cultivos y, desde hace poco más de una década, se siembran en algunos países variedades modificadas genéticamente (MG) principalmente de soja, maíz, algodón y colza. A pesar de la ingente propaganda sobre multitud de funcionalidades, las variedades comerciales incorporan tan sólo dos características: la resistencia a insectos plaga y/o la tolerancia a un herbicida determinado. Un 81% de la superficie de OMG cultivada en el mundo son plantas resistentes a herbicidas [1]

Esta tecnología no es una simple prolongación de la mejora vegetal llevada a cabo por la agricultura tradicional: al permitir franquear las barreras entre especies, crea seres vivos que no podrían obtenerse en la naturaleza o con las técnicas tradicionales de mejora genética. Por otra parte, los conocimientos científicos actuales no son suficientes



para predecir con exactitud todas las consecuencias de la manipulación del nuevo organismo en el que se han introducido genes extraños (frecuentemente desregulados en su nuevo entorno), ni su evolución e interacción con otros seres vivos una vez liberado un OMG al medio ambiente. Según la propia Comisión Europea, “el proceso de creación de organismos modificados genéticamente está rodeado de incertidumbres, que pueden dar lugar a multitud de efectos imprevistos [2]”. Hoy por hoy, se trata, de una tecnología con un nivel de imprecisión muy elevado y cuyos efectos son impredecibles tanto a corto como a largo plazo.

Tras 11 años de cultivo, se ha comprobado que las semillas modificadas genéticamente no reportan los beneficios prometidos por la industria biotecnológica:

- ▶ En promedio no reducen el empleo de productos químicos en el campo, sino todo lo contrario. Por ejemplo, en EE.UU., los tres principales cultivos MG han conducido desde 1996 a un aumento en el uso de agrotóxicos de 55.000 toneladas [3], con enormes incrementos en el volumen de herbicidas aplicados a la soja, al algodón y al maíz tolerantes a herbicidas.
- ▶ Sus rendimientos son menores, o en el mejor de los casos equivalentes a los de las variedades no MG, tal y como lo ha reconocido recientemente el Departamento de Agricultura de EE UU [4], por lo que los argumentos de eficiencia en el uso de recursos como suelo, agua o combustibles carecen de fundamento.
- ▶ Sus impactos sobre el medio ambiente están cada vez más documentados: contaminación de especies silvestres emparentadas, reducción de la biodiversidad, contaminación química del suelo y de los acuíferos son algunos de los problemas asociados al cultivo de OMG.
- ▶ No han aportado mejoras en la calidad de los alimentos, sino grandes incertidumbres sobre la inocuidad de los productos que contienen ingredientes MG, sobre todo a medio y largo plazo.
- ▶ Para los agricultores, la aparición de malas hierbas y de adventicias resistentes a varios herbicidas asociada a los cultivos MG, empieza a ser motivo de preocupación en EE UU y en Canadá. En el caso de los cultivos insecticidas, se reconoce que es inevitable la evolución y proliferación de insectos plaga resistentes: cuestión de tiempo únicamente. Ello obligará a los agricultores convencionales a recurrir a plaguicidas cada vez más agresivos y costosos, mientras que la pérdida de eficacia de insecticidas naturales, como el Bt, será un grave perjuicio para la agricultura ecológica.
- ▶ No contribuyen a aliviar la pobreza ni el hambre en el mundo. Al contrario, las aplicaciones comerciales de la biotecnología en la agricultura están aumentando la brecha que separa a pobres y ricos. Un dato significativo: la mayor parte de las cosechas MG se destinan a alimentación ganadera para satisfacer el consumo de carne – excesivo en muchos casos – de los países ricos.

Si bien la Unión Europea (UE) es una de las regiones del mundo con una regulación más estricta sobre OMG, resulta difícil que los ciudadanos europeos puedan confiar en las instituciones responsables de aprobar y velar por la seguridad de estos productos. En primer lugar, porque el procedimiento de aprobación es claramente antidemocrático: la Comisión Europea tiene la última palabra y puede autorizar la entrada de un nuevo OMG en el mercado europeo aunque una mayoría de los Estados Miembros se hayan pronunciado en contra. Todos los OMG aprobados para comercializarse en la UE desde que finalizó la moratoria en 2004, han sido aprobados por la Comisión Europea utilizando esta prerrogativa. Por su parte, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, que emite recomendaciones para las nuevas autorizaciones, ha sido objeto en los últimos meses de duras recriminaciones por parte de Estados Miembros por su falta de transparencia y por no tener en cuenta adecuadamente las objeciones de los Estados Miembros en el proceso de evaluación. Por otra parte, los estudios científicos sobre los que se basa la evaluación previa a la autorización son realizados por las propias empresas, sin que sea posible en muchos casos verificar los datos y resultados de forma independiente. Pero lo que más desconfianza ha generado son los casos de OMG aprobados pese a la existencia de grandes incertidumbres, o peor todavía, a pesar de evidencias sobre su peligrosidad para la salud y/o el medio ambiente.

Por ejemplo, en 2007 un grupo de expertos del Departamento de Ingeniería Genética de la Universidad de Caen, Francia, publicó en la revista científica “Archives of Environmental Contamination and Toxicology” un estudio en el que se demuestra que las ratas de laboratorio alimentadas con el maíz MON 863 de Monsanto muestran signos de toxicidad en el riñón y en el hígado [5]. El estudio analiza los resultados presentados por Monsanto a la Comisión Europea para obtener la autorización de comercialización en la UE del MON 863, un maíz que produce un nuevo insecticida llamado “Cry3Bb1 modificado”. Sin embargo, la Comisión Europea concedió licencias para comercializar este maíz tanto para el consumo humano como para el consumo animal. Se han hecho llamamientos a los gobiernos para que emprendan una reevaluación urgente de todos los otros productos transgénicos aprobados, y una revisión estricta de los métodos de análisis actuales.

Otro ejemplo es el del maíz Bt 176. El cultivo comercial de transgénicos llegó a la agricultura española en marzo de 1998 [6] con este maíz de Ciba Geigy, hoy Syngenta. Este maíz contiene una modificación genética con tres genes que permiten producir una toxina capaz de matar insectos como el taladro y otros lepidópteros (mariposas y polillas), ser tolerante al herbicida glufosinato de amonio y aportar resistencia al antibiótico ampicilina [7]. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) retiró, en octubre de 2001, las variedades Bt 176 de la lista de productos transgénicos registrados, dado que presentaban riesgo de aparición de resistencia en los insectos [8]. A pesar de esto, el Gobierno español autorizó nuevas variedades Bt 176 casi un año y medio más tarde de la aparición de estas evidencias. En abril de 2004, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó un informe en el que recomendaba la prohibición, a partir de enero de 2005, del cultivo de determinados transgénicos, entre ellos el Bt 176. Posteriormente, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AES) anunció que en esa fecha la [siembra de maíz Bt 176 quedaría prohibida en territorio español](#). En el año 2005 el Gobierno siguió reconociendo que se está permitiendo el cultivo de un maíz cuya comercialización está prohibida según el

Artículo 4 (2) de la Directiva 2001/18, a partir del 31 de diciembre de 2004. Todavía no se ha informado acerca de los impactos generados durante los más de siete años de cultivo.

El análisis de riesgos del maíz MON 810 (el tipo de maíz transgénico que se cultiva en España), aprobado por la UE en 1998 bajo la Directiva 90/220/CE, no incluyó aspectos fundamentales como los efectos a largo plazo sobre la salud humana y/o animal o los impactos indirectos o diferidos sobre el medio ambiente, exigidos por la actual legislación [9]. Es imprescindible actualizar dicho análisis de riesgos, sobre todo teniendo en cuenta la falta de información exacta sobre los genes contenidos en el ADN del evento MON 810 en el momento de su aprobación y los resultados de estudios de caracterización posteriores, que sugieren que el ADN del maíz ha sufrido reordenaciones y/o supresiones a raíz de la transformación [10]. Asimismo, resultan preocupantes las similitudes de la proteína Cry1Ab producida por el MON 810 con la proteína Cry9C del maíz StarLink (retirado en 2000) que presenta características potencialmente alergénicas.

Con respecto a los impactos de estos maíces MON 810 sobre la salud o el medio ambiente, es importante reseñar que el único Plan de Seguimiento disponible a nivel europeo es un documento entregado por Monsanto en 1995, cuando la compañía solicitó el permiso de comercialización, sin que haya habido ninguna actualización desde entonces. Este Plan no cubre ninguno de los asuntos científicos sobre los cuales se viene discutiendo desde la aprobación de este maíz y que, según la Directiva 2001/18/CE, deberían ser tenidos en consideración, incluyendo la estructura del genoma después de la integración de un gen extraño, los riesgos para organismos no-objetivo, los cambios en las rutas metabólicas secundarias de las plantas y la excreción y acumulación edáfica de la toxina Bt.

En un reciente informe [11], se demuestra la alta variabilidad del contenido de la toxina insecticida Bt presente en los maíces MON 810. La investigación, realizada en 2006 a partir de más de 600 muestras recogidas en España y Alemania concluye que las concentraciones de toxina Bt en las plantas son altamente impredecibles y variables, por lo que, por ejemplo, las plantas de un mismo campo llegan a diferir entre sí hasta 100 veces. Además, la concentración de toxina es completamente diferente de los niveles ofrecidos por Monsanto cuando solicitó la autorización para comercializar este maíz. Estos datos arrojan nuevas incertidumbres y preocupaciones con respecto a la seguridad y la calidad del maíz transgénico, y ponen en entredicho el sistema de autorizaciones de la UE.

Al igual que el conjunto de los europeos, una mayoría de la población española se opone a los alimentos transgénicos. En el Eurobarómetro de mayo de 2006, el dato más significativo es que solamente el 34% de los españoles está de acuerdo para que se fomente la biotecnología aplicada a la producción de alimentos. Asimismo, un estudio de marzo de 2004 del Centro de Investigaciones Sociológicas revelaba que cerca del 70% de los españoles considera la modificación genética de ciertos cultivos peligrosa para el medio ambiente y el barómetro español de septiembre de 2006, que los alimentos transgénicos son una de las dos cuestiones relacionadas con la alimentación que más preocupan a los españoles.

Por otra parte, se ha demostrado claramente que no es posible la coexistencia entre cultivos MG y ecológicos o convencionales. Los numerosos casos de contaminación a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde las semillas hasta el producto final, son una demostración clara de que la contaminación transgénica es inevitable. La contaminación de las semillas –que puede alcanzar proporciones nada desdeñables en poco tiempo, como se ha demostrado en EE UU- reviste especial gravedad por su carácter irreversible, impidiendo una posible marcha atrás en caso de ser necesaria la retirada del mercado de determinados OMG. De ahí la exigencia irrenunciable de que se aplique el principio de precaución, relegado al olvido actualmente al permitirse el cultivo de variedades MG en nuestros campos y la introducción de ingredientes transgénicos en nuestros platos.

La utilización de la ingeniería genética en la agricultura no puede considerarse una simple herramienta de producción. El debate sobre los cultivos MG va mucho más allá de la mera aplicación de una tecnología nueva, y plantea ciertas cuestiones éticas que la sociedad no puede eludir:

- ▶ En la actualidad, dichos cultivos benefician exclusivamente a las pocas multinacionales que los desarrollan y comercializan, y que los están intentando imponer agresivamente en todo el mundo. Los grandes intereses económicos en juego dan lugar a todo tipo de presiones políticas por parte de las empresas agro-biotecnológicas y de algunos gobiernos, despreciando totalmente consideraciones ambientales y sociales.
- ▶ Está en juego nada menos que el control de la agricultura y la alimentación en unas pocas manos, lo que puede conducir a una situación muy peligrosa para la independencia y supervivencia de pueblos, países y del conjunto de la Humanidad.
- ▶ La utilización de la ingeniería genética en la agricultura no hace más que exacerbar los efectos perniciosos de una producción industrializada e insostenible, que no favorece a los pequeños agricultores, ni respeta el medio ambiente ni reparte equitativamente las riquezas.

El mundo necesita enfoques agrícolas sostenibles y es hora de que los gobiernos y los especialistas dediquen sus energías y recursos a desarrollar tecnologías y políticas compatibles con la protección del medio ambiente, una producción segura y de calidad y un reparto justo entre todos los seres humanos.

[1] James, C. 2006. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.

[2] European Communities - Measures Affecting the Approval and Marketing of Biotech Products (DS291, DS292, DS293). First Written Submission by the European Communities. Geneva. 17 May 2004.

[3] Who benefits from GM crops? An analysis of the global performance of GM crops (1996-2006)

[4] Fernandez-Cornejo, J. & Caswell. April 2006. Genetically Engineered Crops in the United States. USDA/ERS Economic Information Bulletin n. 11

- [5] Seralini et al., 2007. New Analysis of a Rat Feeding Study with a Genetically Modified Maize Reveals Signs of Hepatorenal Toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52
- [6] Orden 7052 de 23 de marzo de 1998 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se dispone la inscripción de variedades de maíz en el Registro de Variedades Comerciales.
- [7] El empleo de genes marcadores de resistencia a antibióticos ha sido ampliamente condenado por organismos como la FAO, la Royal Society y el Pasteur Institute, a quienes preocupa que estos genes puedan crear resistencias en microorganismos y generar problemas sanitarios en humanos y animales.
- [8] Sloderbeck, P. Current status of Bt Corn Hybrids. Kansas State University, K. State Research and Extension, Southwest Area Extension Office, Garden City, 2002, Kansas.
- [9] Anexo II de la Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de marzo de 2001 sobre la Liberación Intencional en el Medio Ambiente de Organismos Modificados Genéticamente.
- [10] Comunicado de Prensa de ISIS, 9-4-2004, Comment on Assessment ReportC/GB/02/M3/03 (herbicide tolerant and insect resistant hybrid maize, NK603xMon810), Institute of Science in Society
- [11] "¿Qué cantidad de toxina Bt producen realmente las plantas de maíz transgénico MON810?". [Resumen en Castellano](#)

## ALEGACIÓN PRIMERA

---

### **La alteración en el genoma de las plantas transgénicas producida por la casete transformadora insertada, es mucho más profunda de lo afirmado en las notificaciones.**

Diversos informes científicos como por ejemplo el "Risk Assessment of GMO products in the European Union", A. Spök, H. Hofer, P. Lehner, R. Valenta, S. Stirn y H. Gaugitsch y el "Transformation-Induced Mutations in Transgenic Crop Plants", A. Wilson PhD, J. Latham PhD y R. Steinbrecher PhD, así como numerosos estudios realizados los últimos años por científicos independientes de todo el mundo como "The Institute of Science in Society", el Independent Science Panel; el estudio encargado por el Gobierno de Austria, The Unión of Concerned Scientists, los científicos independientes del CRII-GEN etc, muestran la insuficiencia de los análisis de riesgos para la salud de los OMG y la ausencia casi total de la evaluación de riesgos para el ambiente.

Se demuestra la deficiencia del sistema oficial de evaluación, el incumplimiento en las solicitudes de liberación de aportar estudios reglamentarios, la aquiescencia complaciente y acrítica de los organismos evaluadores de algunos países, la insuficiencia o incongruencia de algunos datos genéticos aportados por los notificadores, etc. Dichos informes también demuestran que la inserción de la casete transformante provoca importantes alteraciones en el genoma de la planta receptora, tanto si se utiliza el vector Ti (del Agrobacterium) o la biobalística. Se han realizado pocos estudios, frecuentemente sobre vegetales de genoma muy simple como la Arabidopsis thaliana (que además dispone de un "código archivado" para la corrección de mutaciones, por lo que los resultados no son representativos de las alteraciones más profundas que se produzcan en plantas muy complejas y abundantes en transposones como el maíz.

En el caso del vector Ti se ha observado que la exacta integración del T-ADN (ADN transferido) no es realista (Forsbach, 03).

**La inserción de la casete transformante en el vegetal receptor provoca alteraciones sustanciales :se observan**

#### **a).- Mutaciones en el lugar de inserción**

- Se ha observado deleciones en el lugar de inserción, algunas menores de 100 pb, pero que en más del 20% de los casos son a gran escala. Se han detectado deleciones de 70 Kpb que removieron 13 genes (Kaya, 00). En el 2% de los casos se produjo translocación cromosómica.
- Se ha observado translocación de segmentos de ADN de más de 40 Kpb (Tax y Vernon, 2001).
- Se ha detectado en un 8% de los eventos grandes inserciones adventicias de plásmido o del T-ADN, y en el resto de los casos inserciones de secuencias de menos de 100 pb de ADN de origen desconocido.

En el caso de bombardeo por biobalística se producen alteraciones muy complejas (Pawloski & Somers). Múltiples copias del ADN liberado están frecuentemente intercaladas con fragmentos del ADN del receptor (Kohli et al, 03). También se ha registrado la inserción de ADN cromosómico bacteriano (Ulker et al, 02).

Apenas se han analizado mediante secuenciación del ADN las alteraciones que se producen en el lugar de inserción, pero en los casos estudiados la declarada supuestamente como "única inserción" incluye deleción genómica a gran escala, reagrupamientos genómicos, inserción de ADN adventicio, tramos revueltos del ADN arrancado y del ADN transferido etc. ( Macarevitch et al., 2003).

El estudio de Wilson et al. del 2004 confirma lo anterior y concluye que "ni en la literatura científica ni en los informes remitidos a los reguladores aparece ningún estudio en que la secuenciación del lugar de inserción sea compatible con la existente antes de la transformación". El bombardeo de partículas con Ti-mediación producen frecuentemente la inserción de transgenes dentro de genes codificadores del receptor y/o de secuencias reguladoras (Salguerio et al, 2002).

En el caso del MON-810, estudios posteriores a su autorización detectaron diversas alteraciones genómicas y mutaciones en el lugar de inserción que no habían sido descritas ni informadas. No se pudo localizar ni reconocer en la planta no transformada el lugar equivalente al punto de inserción, lo que indica que el ADN genómico del maíz ha sido reagrupado y/o arrancado en el punto de inserción del transgen Cry 1 Ab. (Holck et al; Hernández et al, 2003).

También el MON-810 se ha detectado que el T-nos y parte del fin de cola 3' del Cry1 Ab han sido suprimidos. El T-nos fue detectado en el genoma, lo que indica que se ha desplazado de su posición original (Scrambling and further Scrambling of GM inserts).

El gobierno austriaco objetó ante la Unión Europea la aprobación del maíz MON-810 que también ha sido prohibido en otros países de la UE.

### **b).-Mutaciones extensas en el genoma receptor fuera del lugar de inserción.**

Además de las mutaciones producidas en el entorno del lugar de inserción, se produce una amplia gama de mutaciones amplias alejadas de ese punto, (wide mutations) provocando alteraciones en la expresión global del genoma transformado.

Se han realizado cinco estudios para evaluar las mutaciones introducidas por la transformación (utilizando técnicas PCR, como RFLP, AFLP...).

Los resultados indican que en todos los casos hubo cientos o miles de mutaciones amplias del genoma receptor. Se estima que el "valor genómico de semejanza" respecto a la planta de control oscila entre el 96 y el 98%, lo que indica una mutación genómica extensiva (Labra et al, 2001).

Estas "mutaciones amplias" (wide mutations) se han observado en todas las plantas transformadas, habiéndose demostrado que son heredables, permaneciendo en el cultivo comercial a pesar de los retrocruzamientos (Sala et al, 2000). Todo ello provoca graves disfunciones en la expresión del genoma transformado que han sido poco o nada estudiadas:

- La disrupción en un gen que codifica proteínas reguladoras provoca la mala expresión en cascada de varios genes, como es el caso de los genes relacionados con la biosíntesis de nutrientes o con la regulación de productos tóxicos.
- Se producen cambios bioquímicos no reseñados y que son muy difíciles de identificar con los mejores test bioquímicos (Kuiper, 2001), siendo improbable que se hayan identificado antes de la comercialización.
- Se ignora si los insertos están dentro o próximos a las secuencias genéticas de la planta transformada. No se ha estudiado específicamente si la mutación amplia disrumpe el ADN funcional, pero hay evidencias que indican que frecuentemente afecta a secuencias funcionales.
- El ADN funcional puede ser extragenético, situado en el genoma silencioso. Las secuencias reguladoras pueden estar a cientos o miles de pb de distancia del gen regulado, incluso actuar en "trans". En los casos en que los genes de la planta transformada aparecen enracimados, se ha comprobado que el ordenamiento también afecta a la regulación genética (Hurst et al 2004).

### **c).- Imprecisión de los análisis Southern blot.**

Las informaciones suministradas por Monsanto en las notificaciones carecen de validez, ya que los análisis moleculares Southern blot utilizados son insuficientes e imprecisos. No sirve para determinar la presencia de ADN adventicio en el punto de inserción, ni para conocer el alcance de la disrupción del genoma en el punto de inserción, ni es adecuado para identificar redistribuciones genómicas a gran escala, ni permite conocer el alcance de las alteraciones de la red epigenética (Mehlo, 2000; Svitashv & Somers, 2001; Kohli 2003):

- En un evento biobalístico, el análisis Southern blot indicaba que el transgen estaba dispuesto como múltiples copias en tándem, pero el análisis de Fiber-fish mostró que entre todas las copias del transgen estaban intercaladas secuencias de 3 a 10 Kpb de ADN genómico (Svitashv & Somers, 2001).
- Una línea transgénica calificada como de una "única inserción" tenía realmente otros dos insertos adicionales de 296 pb que no fueron detectados por el Southern blot (Macarevitch, 2003).
- El SoyBean-RR fue aprobado en 1994, pero hasta el año 2000 no aportó Monsanto información de un fragmento adicional de 254 pb de Cp4-epsps adyacente y otro de 72 pb ligado al transgen, aunque separado por ADN del receptor. El año 2001 se detectó que además había otro fragmento de 540 pb de origen desconocido que no se había informado (Windels & al).

En definitiva, hay gran imprecisión y desconocimiento acerca de los cultivos-MG, siendo evidente su **sustancial diferencia** respecto a la planta no modificada, y la irresponsabilidad de su aprobación.

- Conclusiones del estudio:

Las mutaciones y disrupciones genómicas que se producen en plantas-MG son básicamente desconocidas; siendo sorprendente la falta de estudios sistemáticos al respecto, y la falta de exigencia de utilizar métodos analíticos que permitan una comparación realista del vegetal-MG respecto a las secuencias homologas del vegetal natural.

**d).-Consecuencias funcionales de la alteración del genoma transgénico** debidas a la inserción, delección, reagrupamiento, captación de ADN adventicio, enrucamiento, translocación, etc.

- Pérdida de función genética: algunas delecciones o reagrupamientos en los puntos de inserción son lo bastante significativas para provocar la pérdida o alteración de la función de varios genes (Kaya et al, 2000). También se puede perder o reducir la expresión genética por "transcripción antisentido" cuando un gen duplicado formado en la transformación afecta a un promotor endógeno, originando una transcripción antisentido que silencia al gen endógeno homólogo (Tax y Vernon, 2001; Kusaba, 2003). En ocasiones el apagón de un gen ha afectado a grandes extensiones de cultivos.
- Sobreexpresión genética, o expresión en otros nuevos tejidos o tipos de células. Los potenciadores de expresión que suelen introducirse en la casete insertada, no solo potencian la expresión del transgen, sino que también pueden afectar y sobreexpresar genes propios del receptor.
- Otras disfunciones de la expresión genómica se producen por varias causas:
  - Delección o interrupción de secuencias promotoras o potenciadoras.
  - Modificación del espacio entre algunos genes o translocación de las "secuencias barrera" que evitan que las secuencias reguladoras de un gen afecten a otros.
  - Alteraciones en la distribución de la estructura del genoma debida a las reorganizaciones, que son muy extensas en el genoma del maíz que tiene gran abundancia de transposones.
  - Se ha comprobado que una mutación simple (cambio de un solo par de bases, o una pequeña delección) puede originar alguna disfunción significativa e impredecible.

Las alteraciones en los genomas transformados se traducen en cambios en la composición y funciones proteicas al aparecer, junto a las proteínas exógenas introducidas, proteínas truncadas o mutadas en las que se han podido perder o alterar las secuencias necesarias para la localización celular, para la activación o control de otras proteínas o funciones bioquímicas (como lugares de fosforilación), etc.

**e).- Alteración funcional de la red proteica**

Las proteínas trabajan interconectadas en red agrupadas en conjuntos o "constelaciones" (que a su vez se conectan y organizan en redes o "máquinas" más amplias), por lo que la alteración de una proteína distorsiona al conjunto funcional y a los delicados procesos bioquímicos que inducen y controlan.

- En los conjuntos proteicos que regulan la biosíntesis de nutrientes provocan la reducción del nivel de nutrientes o el desequilibrio en las proporciones a que están ajustadas las redes metabólicas.
- En los relacionados con la producción de toxinas y la regulación de su acumulación resulta alterada la cualidad y cantidad de toxinas.
- Es muy sensible a cualquier alteración la múltiple y compleja familia de las inmunoglobulinas, alterando el sistema inmunológico (que actualmente se muestra crecientemente impotente o desconcertado).
- En los procesos de interrupción (on-off) alteraciones nanométricas bastan para anular, inducir, o invertir el sentido de reacciones bioquímicas básicas (como las que regulan la elección de la ruta metabólica más eficiente en cada situación del organismo y circunstancias ambientales; las que dan la orden de parar la división celular que, al descontrolarse, provoca el cáncer al fallar la apoptosis celular programada, etc.).

**f).- Alteraciones provocadas por el conjunto de elementos introducidos en las cassetes.**

En las cassetes insertadas para la transformación, el transgen se acompaña del promotor, potenciadores de expresión, secuencias de principio y fin de la transcripción, marcadores, etc, que multiplican las alteraciones en el genoma de la planta receptora, incrementan la inestabilidad genómica, y son puntos calientes (hot-spot) para las recombinaciones y las THG.

- La inserción del promotor CaMV-35S puede causar sobreexpresión o expresión anómala de genes próximos, incluso distantes varios miles de pares de bases (Wilson, 96; Weigel, 2000; Jeong, 2002).
- La inserción de ADN adventicio (procedente del plásmido bacteriano, del marcador, del transgen, o de captación secundaria, etc.) facilita las THG a bacterias ambientales del suelo, o del intestino animal, por recombinación homóloga.
- El "origen de replicación" del plásmido también facilita la THG.

## Las conclusiones del estudio "Risk Assessment of GMO Products in the EU" señalan:

- Los documentos-guía (draft guidance) son muy insuficientes y carentes de concreción. Los estudios aportados a las notificaciones no son suficientes ni detallados.
- Se recurre a la "equivalencia sustancial" como si fuera un "punto final" o dogma inamovible, en lugar de ser un antiguo punto de partida que se estableció sin ningún fundamento científico, siendo totalmente insostenible con el conocimiento actual de la genómica estructural y funcional, y según los estudios realizados durante todos estos años de las plantas modificadas genéticamente.
- Las notificaciones contienen asertos y conclusiones arbitrarias, que no están basadas en estudios adecuados o ni siquiera están verificadas. Se incluyen informes y estudios incompletos de imposible evaluación.
- Las evaluaciones de riesgos y seguridad presentadas suelen estar insuficientemente o nada justificadas, basándose en pruebas indirectas y/o razonamientos especulativos, siendo escasos e insuficientes los ensayos y experimentos directos.
- No se estudian los importantes efectos secundarios producidos por la transformación, incluso se niega su existencia a pesar de estar abundantemente descritos (Stirn 98; FAO/WHO 2000; R. Society of Canada, 2001 etc.).
- Los "ensayos de campo" no están diseñados adecuadamente, o lo están para "no mirar lo que no se quiere ver". Faltan totalmente investigaciones sobre riesgos y daños ambientales que son fundamentales.
- Las notificaciones suelen referirse a pruebas "in vitro" con fluidos gástricos simulados para determinar, por ejemplo, la degradación de las toxinas contenidas en los alimentos transgénicos, a pesar de que diversos estudios muestran su ineficacia. El comité científico en alimentos de la UE afirma: "se conocen proteínas que aisladas resultan totalmente degradadas en digestión simulada, sin embargo sobreviven intactas al paso por el sistema digestivo cuando se ingieren dentro de la dieta habitual; por lo tanto la evidencia debe obtenerse basándose en datos obtenidos en vivo". Además, la digestión simulada nada indica acerca de la posterior ruta del CP4 o de sus catabolitos. Los transgenes pueden sobrevivir el paso por el sistema digestivo y pasar a otros órganos (The fate of transgenes in the human gut, Nature Biotechnology 2002).
- Los ensayos y datos adjuntados en las notificaciones referentes a la toxicidad y alergenicidad de las proteínas en las plantas-MG son totalmente insuficientes:
  - Se limitan a la nueva proteína introducida, ignorando las proteínas truncadas, alteradas o inéditas codificadas por el genoma alterado de la planta MG, así como las que resultan silenciadas, sobreexpresadas, o en proporción desajustada a los procesos bioquímicos que regulan.
  - Suelen referirse a la nueva proteína en su estado natural, y no a la que realmente se produce en la planta-MG que es distinta y, aunque sea homóloga, puede producir efectos fisiológicos muy diferentes: Las proteínas EPSPS naturales producidas por distintas plantas a pesar de tener un 99,3% de homología tienen distinto comportamiento, incluida su sensibilidad para inhibir los efectos del glifosato (Padgett et al.).
  - La falta de homología con otras toxinas conocidas no significa que carezca de otros efectos tóxicos no descritos: no es suficiente para declarar que carece de efectos tóxicos sin previa verificación.
  - Se realizan pruebas de toxicidad aguda, pero las características de las alteraciones proteicas en los alimentos transgénicos inducen enfermedades degenerativas de lento desarrollo, por lo que son imprescindibles pruebas de larga duración y de las generaciones siguientes.
  - Las toxinas suelen acumularse en el organismo; la presencia incidental de alguna toxina en dosis tolerable no es relevante en el caso de una dieta muy diversa en especies y variedades, pero se puede alcanzar pronto dosis críticas con la dieta actual, muy uniforme procedente de unos pocos monocultivos-MG de variedades clónicas de soja, maíz, arroz etc., ingeridos directamente o a través de la carne y leche animal.
  - En alergenicidad, pequeños cambios estructurales pueden producir grandes diferencias: la proteína **Bet.v.1<sup>a</sup>** muestra alta actividad IgE, mientras que el **isómero Bet.v.1I** la tiene muy baja.

- Pueden aparecer efectos disruptores de procesos bioquímicos por una mutación simple en la proteína de la planta-MG. La misma proteína, con idéntica sucesión de secuencias se convierte en patógena cuando se altera su plegamiento por mecanismos mal conocidos (priones, como es el caso de la encefalitis espongiforme, parkinson, Alzheimer, etc.).
- El estudio de toxicidad del vegetal-MG debe realizarse sobre la planta entera y con todo el tratamiento RR, incluyendo todos sus componentes, algunos de los cuales han sido señalados como disruptores endocrinos.

Los investigadores que realizaron los estudios antes señalados, han mostrado su sorpresa por las insuficiencias de la draft guidance y de su cumplimiento en las notificaciones.

- Es sorprendente la comercialización de productos que son básicamente desconocidos. Faltan estudios sistemáticos acerca de las mutaciones amplias y en el punto de inserción de los genomas transformados. No se conoce prácticamente nada, y lo poco conocido es previsiblemente muy insuficiente para extrapolarlo a genomas complejos como el maíz.
- Es sorprendente que no se realicen ni se exijan los métodos analíticos que permitan una comparación realista entre las secuencias del genoma transformado y las secuencias homólogas del vegetal natural, utilizando la secuenciación de ADN y las mejores técnicas de PCR.
- Es sorprendente que no se estudien las consecuencias ambientales dramáticas derivadas del incremento de THG entre microorganismos, y de las recombinaciones víricas propiciadas por la inestabilidad y los hot-spot de los genomas transgénicos, así como la dispersión en el ambiente de secuencias infectivas polivalentes derivadas de los promotores potenciados, etc.

Parece que la "sorpresa" de los investigadores es un eufemismo académico para referirse a la ineptitud y/o corrupción en todos los niveles técnicos y administrativos encargados de la evaluación y autorización de OMG.

## **ALEGACIÓN SEGUNDA**

---

### **Los fundamentos que pretendían justificar los cultivos basados en el "ADN recombinante" son falsos.**

No es válido el dogma del determinismo genético, ni es cierta la supuesta "equivalencia sustancial". Como señala el doctor Brenner, Premio Nobel de Medicina 2002, "no entendemos básicamente nada del genoma, lo que creíamos comprender estaba equivocado". La transformación provoca en el genoma de las plantas transgénicas modificaciones sustanciales que no se limitan a la adquisición de ciertos rasgos agronómicos conferidos por un gen determinado.

- El genoma es, en si mismo, un sistema complejo con múltiples interacciones entre los genes, tanto simultáneas como en cascada, y con abundantes bucles de retroalimentación, todo ello en interrelación con las condiciones del medio celular, el ambiente interno intercelular, y el medio ambiente externo.
- Genoma fluido (Mae Wan Ho). La expresión de los genes sufre modificaciones y ajustes según las condiciones fisiológicas y ambientales. Los genes mutan, cambian de sitio, se reordenan, replican, eliminan o insertan secuencias e incluso las intercambian con otros genomas. La función génica es dispersa, dinámica, e interactiva.
- Según el sistema de redes (F. Capra, 2002), hay que considerar la expresión de la "red epigenética". "La replicación de una célula no es sólo transmisión del ADN celular y del ADN bacteriano simbiótico; también es la transmisión del conjunto de enzimas, orgánulos, sistema endomembranoso, etc., es decir, de toda la red celular autopoiesica, en la que se puede diferenciar, conceptualmente, la red genómica y la red metabólica. El estudio solo puede intentar abordarse por las "matemáticas de la complejidad" (Goodwin, 2000).
- El ADN silencioso, antes despreciado como "ADN basura", se descubre que ejecuta funciones importantes: los retrotransposones (que ocupan mas de un tercio del genoma humano y son muy abundantes en el del maíz), pueden regular la expresión de múltiples genes, alterar su función (B. Knoules, 04), o modular su respuesta ante las cambiantes condiciones ambientales. Las investigaciones acerca del genoma silencioso ha sido consideradas como uno de los avances científicos mas importantes del año 2004.
- Las proteínas tampoco tienen el carácter específico atribuido en la notificación. Recordamos:
  - Basta, que se sustituya un solo aminoácido en una larga poliproteína de 1.500 aminoácidos, para que



la proteína modifique su estructura y función (caso de la anemia falciforme, o de la fibrosis quística debida a un solo cambio en la cadena de los aminoácidos, etc.).

- La misma proteína con idéntica fórmula química y secuencia, puede convertirse en letal al modificar su forma de plegamiento (la proporción entre hélices alfa y placas beta), además de poder infectar y reproducirse, quizás por combinación con algún o diversos elementos genéticos móviles que actúan como coprión (Manuelidis), como es el caso del prión de la EEB (Encefalitis Espongiforme Bovina), o el plegamiento de la cromatina que es mortal en niñas, el Parkinson, Alzheimer, etc.
- Las proteínas actúan agrupadas en consorcios que interactúan entre si, los cuales se agrupan a su vez en redes de interacción mas complejas, ya sea en interacción estable o limitada a determinadas fases del ciclo celular. Una misma proteína puede formar parte de varios consorcios o constelaciones de la red interactiva, alterando diversos procesos biológicos.

## ALEGACIÓN TERCERA

---

**Los daños ambientales producidos por la contaminación genética procedente de los cultivos transgénicos son extremadamente graves, son irreversibles, y se multiplican en la Biosfera.**

La degradación del Medio Ambiente externo (en el que vivimos y se desarrollan los procesos bióticos) está también dentro de nuestro organismo, y se refleja en el **Medio Ambiente Interno**, inter e intracelular.

**El transgen exógeno no es la única ni la principal causa del potencial patógeno de los transgénicos**, es más grave la presencia de segmentos significativos de los agentes virulentos utilizados para la transformación, que pueden recomponer las secuencias eliminada por recombinación y transferencia horizontal de genes).

Para conseguir la introducción de un gen extraño (de otra especie, incluso de otro reino, caso de gen de pez en fresas) se utilizan vectores y promotores procedentes de agentes infecciosos como el *Agrobacterium tumefaciens*, el Virus del Mosaico de la coliflor CaMV, etc que existen en la Naturaleza infectando a especies específicas, pero que son modificados, a fin de que puedan atravesar las "barreras entre especies", con la adición de numerosos ganchos (secuencias multirreconocibles) que les convierte en agentes multi-infecciosos.

La consecuencia de todo ello es que los transgénicos, atravesando la barrera entre especies, rompen el equilibrio natural entre mutabilidad y estabilidad que es fundamental: si la mutabilidad es muy alta, se exacerba la aparición de nuevos patógenos y efectos teratógenos. Si no hubiera mutación no hubiera sido posible la evolución ni las "mutaciones adaptativas" a condiciones ambientales cambiantes.

Se han producido ocasionalmente mutaciones casuales que originaban nuevos patógenos (caso de la *Yersinia pestis*) a través de improbables caminos estrechos y tortuosos, pero la Biotecnología transgénica ha construido verdaderas autopistas para las THG y recombinaciones virulentas (Mae Wan Ho).

La profunda alteración de la relación en el equilibrio Estabilidad-Mutabilidad, que se mantenía en una tasa aproximadamente constante, facilita la aparición de nuevos patógenos y la frecuencia de los saltos a otras especies de enfermedades que antes eran específicas y exclusivas de alguna.

Además está modificando profundamente la composición y funcionamiento de la enorme biomasa bacteriana, mucho mayor que la de todos los seres vivos superiores, que es la que regula las funciones vitales de la Biosfera (creación del suelo fértil, fuente primaria de la alimentación a través de la cadena trófica; conservación de la composición gaseosa constante de la atmósfera, etc.).

- Hay crecientes evidencias de que los alimentos transgénicos, así como la contaminación genética procedente de cualquier cultivo-MG (es indiferente que se trate de un cultivo alimentario, forestal, de fibras textiles o de agrocombustibles) son responsables, por si solos y/o en combinación con otros factores, de numerosas patologías en rápida expansión o emergentes.
- Incremento de sensibilizaciones alérgicas; deficiencias nutritivas en oligo y micronutrientes; obesidad epidémica; formación de priones y expansión de las enfermedades degenerativas relacionadas con los priones como Alzheimer o Parkinson; enfermedades cardiovasculares; disfunciones hormonales, incluyendo las de las hormonas sexuales; formación de algunos tipos de cáncer; deficiencia, desconcierto e incapacidad del sistema inmunológico, etc.
- Responsabilidad en la rápida propagación de multiresistencias bacterianas a los antibióticos, tanto directamente por el uso de marcadores, como indirectamente al facilitar la transferencia de genes de resistencia.

- Responsabilidad en la actual oleada de THG. Incremento continuo de las mutaciones y recombinaciones en bacterias y virus, emergiendo nuevas enfermedades. Patógenos que eran específicos de ciertas especies saltan y se adaptan a nuevos hospedadores (saltos oveja-vaca; vaca-Humano; aves-cerdos; aves-Humanos, etc.).

De todo esto se deduce la coherencia y racionalidad mercantil de la íntima fusión entre la producción de medicamentos y la de transgénicos. Son una misma empresa con ambas secciones que se complementan y retroalimentan.

La aprobación y valoración oficial de los transgénicos es un irresponsable fraude científico, denunciado reiteradamente por Instituciones de científicos independientes (como ISIS, Institute of Science in Society), por numerosas Uniones de Científicos Comprometidos existentes en todo el mundo; por el ISP (The Independent Science Panel); por las Asociaciones de Defensa del Medio Ambiente, etc.

Los promotores polivalentes potenciados introducidos en los cultivos MG favorecen la creación e patógenos más letales y/o resistentes a los antibióticos y facilitan el salto de enfermedades a otras especies y reinos aumentando el número de hospedadores de los virus.

Aunque los plásmidos infectivos introducidos estén “mutilados o incompletos” pueden adquirir fácilmente por THC las secuencias suprimidas que necesitan para su supervivencia y reproducción. La población microbiana ambiental sirve de vehículo y reservorio de THGs primarias y secundarias (Revisión sobre supervivencia de bacterias y del “ADN desnudo” en distintas condiciones ambientales: Jager y Trappeser, 96).

El ADN recombinante puede soportar el paso por el sistema digestivo y permanecer en el suelo durante dos años o indefinidamente incorporado a biofilms quiescentes.

**El promotor CaMV-35S** procede del virus del mosaico de la coliflor, pero potenciado por síntesis recombinante con una amplia gama de secuencias virales que le convierten en polivalente y multiinfectante.

A diferencia del natural que solo infecta a crucíferas, el CaM-35S:

- Es activo en mono y dicotiledóneas, en hongos, algas, coníferas, células de animales etc.).
- Es activo en animales y células humanas (Microbial Ecology in Health and Disease (2000, 12, p 189; M.W.Ho, A. Rian, J. Cummins 2001). Aunque tiene distintas secuencias que los promotores de virus animales tienen cuando menos los TATA-box en común, pudiendo activar proto-oncogenes y secuencias provirales durmientes.
- Es activo en bacterias como la Yersinia enterocolítica, en bacterias del suelo como la A. rhizogenes y en la Escherichia coli que es omnipresente y está integrada dentro del cuerpo humano en relación simbiótica (Jacob et al, 2002). La actividad en la E. coli es particularmente grave, al ser una bacteria muy promiscua que actúa como reservorio y distribuidor universal de secuencias de ADN entre el universo microbiano, bastando un mínimo fragmento de 20 pb de homología para que se produzca la recombinación.
- El **CaMV-35S** puede causar sobreexpresión o expresión anómala en genes situados a varios miles de pares de bases de distancia de su punto de inserción.

La sobreexpresión de los transgenes ligados al CaMV-35S incrementa la inestabilidad genómica de la planta-MG, y también proporcionan “puntos calientes” para las transferencias horizontales de genes.

- Es preocupante que el CaMV-35S está estrechamente relacionado con el virus de la hepatitis-B, y tiene secuencias análogas al del SIDA.
- 

#### **La información referente a la dispersión del polen del maíz es incorrecta**

- Se elude la dispersión entomófila, realizada por insectos sensibles a la toxina de los cultivos-Bt: lepidópteros, abejas, etc. Se han detectado transgenes y toxinas en el aparato digestivo de larvas de abejas que pueden trasladar el polen a distancias superiores a los 2 kilómetros. La diseminación entomófila puede alcanzar varios kilómetros, y la extinción o menoscabo de los insectos polinizadores mas importantes afecta a toda la agricultura y a la polinización de las especies silvestres. También representa la desaparición de la apicultura ecológica (y en realidad, de toda la apicultura, ya que la convencional nunca es competitiva, con importaciones asiáticas).

- Las referencias a la dispersión anemófila de los granos de polen (una planta de maíz produce unos 20 millones de granos de polen) son insuficientes o inexactas.
  - Los porcentajes de hibridación cruzada en el maíz obtenidos durante tres años de ensayos por Jones & Brook, a distintas distancias del campo de maíz emisor del polen fueron: 1,6% a 200 m y 0,2% a 500 m.
  - Los ensayos de Salamov, arrojaron los siguientes resultados: 0,5% a 200 m, 0,8% a 600 y 0,2% a 800 m. Estos últimos ensayos se realizaron a favor del viento dominante, demostrando que según sean las características del viento que sopla sobre el campo de maíz, el depósito de polen a 600 m es mucho mayor que en zonas próximas de 200 m. Esto ya había sido ampliamente estudiado en el caso de la "pluma radiactiva" de las centrales nucleares, con el mismo resultado de que el depósito de ceniza radioactiva era mayor en zonas mas alejadas que en otras más próximas.

La dispersión del polen depende de muchas circunstancias (orografía del terreno, condiciones climatológicas, existencia de corrientes ascendentes, turbulencias ,situación respecto al viento dominante,...), pudiendo llegar en condiciones favorables mas lejos de los 800 m a que se limitan los ensayos realizados (Treu & Emberlin, 2000). Estos autores también señalan el alto riesgo de presencia de polen-MG en la miel.

Por lo tanto, los daños causados por los cultivos-RR:

- Se extienden a mucha distancia de los cultivos-RR, matando predadores de plagas que comieron insectos no sensibles a la toxina pero portadores de ella, que volaron después hasta otros campos alejados.
- Afecta a cualquier especie da planta cultivada , cuyas plagas son controladas por los predadores ó polinizadores que han sido dañados o exterminados por los cultivos-RR.
- Afecta a todos los agricultores. También a los cultivadores de maíz transgénico, debido a su progresiva ineficacia, gastos crecientes, conflictos con otros granjeros, o la aparición de efectos colaterales imprevistos, como el "apagón del gen-Bt" cuando, en determinadas condiciones ambientales, perdió toda su eficacia . Se han arruinado muchos pequeños granjeros en USA y Canadá a pesar de las ayudas. Respecto a los rendimientos, el resultado de 6.200 pruebas de campo indicó un rendimiento del 6,7% menor para los cultivos-MG.
- Dificulta y puede extinguir a medio plazo la agricultura ecológica. La "coexistencia"es imposible, produciendo a medio o corto plazo la contaminación de los cultivos ecológicos

## ALEGACIÓN QUINTA

---

está ampliamente documentada la aparición de resistencia en adventicias lo que ha obligado a utilizar dosis crecientes de herbicidas de 2 hasta 5 veces mayores; también está documentada la transmisión de la resistencia a plantas silvestres creando supermalezas, lo que afecta a todos los agricultores además de afectar a la diversidad, equilibrio y estabilidad de los ecosistemas forestales, agrarios y lacustres.

Los estudios de la universidad de Manitoba concluyen que "los campos de cultivo-MG, no solo crean supermalezas, sino que son en si mismos campos de supermalezas incontrolables".

La formulación comercial Roundup Ready además del glifosato contiene surfactantes que son tóxicos, disruptores hormonales (Nicolás Olea, U. de Granada), cancerígenas (relación acrilamida, ISIS) etc. También.

La destrucción por trituración, siega, gradeo, etc., es solamente "barrer para debajo de la alfombra". Sólo destruye y fragmenta el aspecto y estructura física de la planta, pero no impide la transferencia a los microorganismos del suelo de las secuencias y elementos genéticos contenidos en las casetes insertadas en la planta, por lo que la introducción de transgenes y plásmidos en otros vegetales puede ocurrir sin necesidad de ser polinizados

Se afirma en la notificación que la proteína CP4 expresada es similar a la de la soja-RR, en la que, según afirman, no se han encontrado efectos indeseables, pero ambos asertos son inexactos:

- Hay correlaciones estadísticas realizadas en el Reino Unido, donde la soja presentaba escasa reacción alérgica, pero desde la introducción de la soja transgénica se ha disparado el número de personas alérgicas a la soja, al mismo ritmo de la sustitución de la soja natural por la modificada.
- El Dr. Pusztai ha señalado los efectos nocivos de las patatas-MG.

- Se ha detectado en ratas alimentadas con patatas-MG la formación de tumores, daños en el cerebro y atrofia en el hígado (Stanley, 99).  
Se han detectado producciones anormales de estrógenos en los cultivos resistentes al glifosato.

Por otra parte, los ensayos referidos en la notificación, parecen referirse la proteína CP4 epsps sin la sustitución en dicha proteína de la leucina por una prolina, o sea que los ensayos no se realizaron con la proteína CP4 EPSPS L214p, que es la realmente producida en cultivo-RR.

En cualquier caso, no puede limitarse la consideración a las proteínas introducidas o sobreexpresadas por la transformación, ya que las tres casetes introducidas en la transformación representan una distorsión sustancial en la expresión de la red epigenética, que forzosamente se traduce en la modificación de otras proteínas de la planta, así como en el desarrollo de los procesos bioquímicos que regulan.

Las manifestaciones referentes a la conservación de la fertilidad del suelo carecen de validez; no se explicitan los parámetros de fertilidad del suelo que se han utilizado en los posibles estudios; si estos se refieren a análisis teóricos o ensayos prácticos de campo; si se han adicionado fertilizantes: se ignora la situación de partida previa a los supuestos estudios. La situación es muy distinta según se parta de un terreno natural o de agricultura ecológica autofértil, o bien de un terreno degradado por la agroquímica previa, en que la fertilidad se obtiene por aportación externa de nutrientes. En el caso de suelos autofértiles por la actividad de la microbiocenosis edafógena, son concluyentes los resultados que reflejan la degradación tras los cultivos-RR.

Lo que tendría que ser obligatorio por ser imprescindible es el análisis microbiológico de los suelos antes de autorizar cualquier cultivo, junto a la análisis posterior, a fin de observar la evolución de la microbiocenosis y, sobre todo, la transferencia a los microorganismos del suelo de los transgenes, plásmidos y secuencias genéticas móviles procedentes de la transformación o derivadas de la alteración de otras expresiones genómicas derivadas de la modificación de las redes genómicas y metabólicas de la planta.

## **ALEGACIÓN SEXTA**

---

### **Perjuicios económicos causados por el cultivo de transgénicos en Castilla y León**

Los perjuicios comerciales y monetarios para las Regiones que no están libres de transgénicos se producen simplemente por ser Regiones susceptibles de contaminación genética aunque no se hubiera investigado, comprobado y difundido la existencia de tal contaminación. La devaluación de la producción se produce automáticamente por la mera tolerancia de los cultivos transgénicos aunque se falsee o se oculte el daño para la salud y el grave e irreversible impacto medioambiental de la contaminación genética, ya se deba esta al cultivo de alimentos o de otros vegetales o árboles alimentos

Los cultivos-MG son una estafa al agricultor, teniendo la experiencia de que en Argentina, Norteamérica, Canadá,... han arruinado a numerosos pequeños agricultores con un tamaño de la explotación, calidad del suelo, maquinaria y recursos técnicos superiores a los que tienen los productores de nuestra Región. Los cultivos transgénicos son un gran negocio en condiciones muy particulares: explotaciones de decenas de miles de hectáreas con desmesurados medios de maquinaria (cosechadoras gigantes, avionetas de fumigación, etc.), con terreno fértil expoliado o adquirido a precios ínfimos y al que exprimen y degradan en una década, con mano de obra barata, con subvenciones para la exportación, etc.

En el caso concreto de Castilla y León son particularmente indeseables los cultivos y liberaciones de Organismos Modificados Genéticamente por tratarse de una de las regiones europeas con mayor biodiversidad, tanto de especies silvestres como de variedades cultivadas; y por causar un grave perjuicio económico ya que la agricultura, ganadería e industrias de ellas derivadas (alimentaria, vitivinícola, etc.) representan un sector estratégico fundamental, tanto históricamente como en la actualidad.

La predilección de las Corporaciones de transgénicos por Castilla y León se debe sin duda a la inusitada permisividad de los organismos de evaluación y control autonómicos, mantenida continuamente desde la primera liberación en España: un ensayo de colza (*Brassica napus*) realizado en Valladolid en el año 1993.

Debido a las duras condiciones climatológicas y edáficas (heladas, escasa pluviosidad, suelos poco profundos con horizonte húmico pobre, o suelo esquelético en los páramos,...) su productividad nunca puede ser competitiva respecto a la de la España o la Europa húmeda, para ciertos productos, ni respecto a la de la España mediterránea y cálida para los otros.

La competitividad y supervivencia del sector solo puede basarse en una producción alimentaria de gran calidad y alto valor añadido, con la exportación hacia un público europeo de alto poder adquisitivo, muy exigente y bien

informado. El objetivo de identificar a Castilla y León con productos de excelente calidad alimentaria y gastronómica, es reiterado con gran énfasis en las declaraciones y publicaciones institucionales así como en las diversas ferias, congresos, foros alimentarios y promociones gastronómicas patrocinadas por la Junta de C y León.

Los estudios y encuestas realizados referentes a la percepción de los ciudadanos europeos respecto a los alimentos y cultivos-MG muestran un profundo rechazo a los transgénicos, así como un malestar generalizado contra las decisiones de la Comisión que en ocasiones contradicen al Parlamento Europeo y que se han agudizado contra las actuaciones del anterior Comisario Fishler y contra la corrupción en la EFSA. Un malestar que ha sido firmemente explicitado por los Gobiernos de algunos países como Austria.

Recientemente un centenar de regiones Europeas y 3.500 comarcas subregionales (principalmente agrícolas y con denominaciones de origen prestigiosas han manifestado durante la Semana Verde Internacional de Berlín su oposición a los cultivos MG, elaborando el "Manifiesto de Berlín para las regiones libres de OMG y la diversidad en Europa".

En la reunión de Florencia el día 4 de Febrero de 2005 se firmó el documento común "Europe's Regional Governments and Local Authorities Charter", estando presentes algunas regiones españolas como Asturias y País Vasco, y resultando llamativa la ausencia de la región castellano y leonesa de indiscutible vocación y aptitud para la producción alimentaria de calidad, la cual resultará gravemente perjudicada por los cultivos-MG que impedirían su competitividad respecto a los productos alimentarios y las "Denominaciones de Origen" procedentes de las regiones libres de transgénicos. También un condado californiano de importante producción vitivinícola se ha declarado como zona libre de transgénicos.

La contaminación genética producida por los cultivos MG terminaría en breve plazo con las certificaciones ecológicas y con la práctica efectiva de la agroecología, que es la única que asegura la ausencia de transgenes exógenos, disruptores endocrinos, proteínas exógenas o truncadas, nuevos alérgenos, contaminantes químicos, etc.

Recordamos el caso de países, como Argentina, que habían sido principales exportadores de alimentos ecológicos y actualmente no pueden certificar su producción debido a la contaminación genética generalizada. Mientras en Aragón, Andalucía, Navarra ya se ha detectado contaminación transgénica en variedades autóctonas, en Castilla y León no se ha detectado nada oficialmente por la simple razón de que nada se controla ni investiga suficientemente.

Todo ello erosiona comercial y financieramente la viabilidad de nuestra agricultura en un momento particularmente crítico en el que al incremento del coste de los insumos y gasóleo agrícola y la sequía, se añade la drástica reducción de las subvenciones comunitarias debida al acercamiento del PIB autonómico a la media comunitaria, incremento del PIB que es ficticio, debido al sobreprecio abusivo en la hipertrófica industria inmobiliaria. Por el contrario, la renta agraria ha disminuido durante este periodo (como muestran los estudios financieros al respecto) pagando injustamente las agricultores las consecuencias de una especulación constructora y recalificadora desorbitada, lo que, a su vez, incrementó el precio de las tierras de labranza.

. Valladolid, 6 de marzo de 2006

### **Anexo III.- Documento 2º . Resumen de algunas Alegaciones en 2005.**

#### **1º).- Los ensayos referidos en las notificaciones son insuficientes, defectuosos e inconsistentes.**

a).- Se observan grandes diferencias en el nivel de detalles de los estudios aportados en las diversas notificaciones, y los documentos-guía adolecen de falta de concreción.

b).- Las evaluaciones de riesgos y seguridad que se presentan suelen estar insuficiente o nada justificadas, basándose en pruebas indirectas y/o razonamientos especulativos, con insuficiente realización de test y experimentaciones directas.

c).- Se utiliza frecuentemente la supuesta "equivalencia sustancial" como si tuviera un valor absoluto que exime de realizar las pruebas que deberían confirmar o rechazar esa suposición inicial. Una simple hipótesis de partida que no tiene ninguna justificación científica se considera como si fuera el "end point" final.

d).- No se estudian los efectos secundarios derivados de la transformación, incluso se niega su existencia, a pesar de estar abundantemente descritos (R. Society of Canadá , 2001; FAO/WHO, 2000; Stirn, 1998, etc.).

e).- La homología en las secuencias de proteínas se utiliza incorrectamente : Por una parte, se realizan ensayos de toxicidad o alergenicidad utilizando no la proteína realmente producida por la planta-MG , sino la proteína bacteriana de la que deriva, homóloga pero no idéntica (ignorando evidencias verificadas, como es que las diversas proteínas EPSPS estudiadas que, a pesar de tener un 99,3% de homología, difieren ampliamente en su comportamiento (Padgett et al). Por el contrario, la falta de homología con las secuencias de toxinas conocidas, se considera prueba suficiente de inocuidad, a pesar de que ello no implica la ausencia de otros efectos tóxicos o disruptores aun no descritos, tanto más como a consecuencia de la transformación se expresan proteínas truncadas o nuevas, que difieren de las que están presentes en los alimentos naturales.

f).- Se recurre frecuentemente a pruebas "in vitro" con fluidos gástricos simulados (p. ej.: para demostrar la rápida degradación de toxinas introducidas en el alimento-MG por la transformación), a pesar de su insuficiencia evidenciada en diversos estudios. El Comité científico en alimentos de la UE. afirma: "Se conocen proteínas que, aisladas, resultan totalmente degradadas en digestión simulada, sin embargo sobreviven intactas al paso por el sistema digestivo cuando se ingieren dentro de la dieta habitual....la evidencia debe obtenerse (basarse) en datos obtenidos in vivo" <sup>(1)</sup>. [posteriormente se vería que tampoco era cierta la degradación en fluidos simulados (respuesta 79)].

g).- Suelen realizarse únicamente pruebas de "toxicidad aguda", pero no puede suponerse que las proteínas solamente pueden provocar efectos de toxicidad aguda. Proteínas como las toxinas-Bt pueden provocar en el receptor cambios a largo plazo: hormonales, en el sistema inmunológico, en el metabolismo, etc., así como efectos de "segunda generación". Todos los estudios de toxicidad o alergenicidad presentados son científicamente inconsistentes e insuficientes.

Son necesarios verdaderos Estudios de Toxicidad a largo plazo y transgeneracionales, referidos al vegetal completo, al alimento completo y a los productos procesados derivados (aceite, harina, almidón, etc.).

h).-Se consideran únicamente (y de forma inadecuada) las proteínas introducidas en las cassetes insertadas, pero no las nuevas proteínas adventicias producidas por la transformación : proteínas quiméricas, truncadas, alteradas o inéditas, originadas a consecuencia de las deleciones, translocaciones y reagrupamientos que distorsionan la expresión de las redes epigenéticas, metabólicas y proteicas del vegetal receptor.

#### **2º).- La transformación produce en el genoma receptor múltiples alteraciones no descritas en las notificaciones.**

Las notificaciones ignoran o niegan observaciones bien documentadas como son las siguientes observaciones:

- Translocaciones del ADN genómico desde otras regiones del genoma, incluso de 40 Kpb (Tax, 2001).
- Delección del ADN del receptor de hasta 75,8 Kpb afectando a 13 genes (Kaya, 2000).
- Se han observado duplicación de secuencias del transgen o de sus fragmentos (Forsbach, 2003).
- Inserciones adventicias de múltiples fragmentos de ADN procedentes del transgen o de los plásmidos.
- Revoltijo entre el ADN del transgen y el del receptor (en la considerada como "simple inserción", los

transgenes están flanqueados por numerosos fragmentos de ADN) (Makarevitch, 2003, Kohli et al 03).

- Se producen reagrupamientos o enrucamiento de genes.
- Las alteraciones tras el bombardeo biobalístico son extraordinariamente complejas (Pawloski & Somers).
- Se ha registrado la inserción de ADN cromosómico bacteriano (Ulker, 02).
- Los transgenes y las secuencias de ADN adventicio se insertan frecuentemente dentro de ADN funcional de la planta (secuencias codificadoras o reguladoras...) que son "puntos calientes" de actividad.
- La inserción de ADN adventicio de plásmido bacteriano (del promotor, marcador, secuencias mejoradoras, terminadoras de transcripción....) son "puntos calientes" que facilitan la THG a otros organismos y a bacterias.

#### **Conclusiones del estudio:**

- Las mutaciones y disrupciones genómicas que se producen en plantas-MG son básicamente desconocidas.
- Sorprende la falta de estudios sistemáticos al respecto y la falta de exigencia de utilizar métodos analíticos que permitan una comparación realista del vegetal-MG respecto a las secuencias homologas del vegetal natural.
- Sorprende la falta de estudios sistemáticos sobre impactos ambientales de las liberaciones de transgénicos.

#### **- 3º) .- Los informes sobre evaluación de riesgos contenidos en las notificaciones son incorrectos**

Los análisis de riesgos aportados en la notificación son simples asertos, se desprecian sistemáticamente los riesgos, invierten la "carga de la prueba", ignoran el Principio de Precaución, omiten datos relevantes, no se cuantifican otros, y se tergiversan muchos:

a).- En la notificación presentada se hacen referencias frecuentes al determinaciones y licencias concedidas por la FDA que consideramos que carecen de validez teniendo en cuenta:

- Son determinaciones y licencias concedidas en los primeros tiempos de la investigación biotecnológica y que no estaba desarrollada ni la genómica ni la proteómica estructural.
- Recordemos también el desprestigio y falta de credibilidad de la FDA:
  - La promiscuidad entre la FDA y las empresas biotecnológicas en casos como, por ejemplo, Margaret Miller, M. R. Taylor, etc.
  - La declaración del Senador Tom Harkin ante el caso StarLink (¿Qué sistema regulador tenemos cuando la contaminación ha tenido que ser descubierto por una ONG?
  - La Declaración del Director de la Oficina de Seguridad ante el Senado de los EEUU.
  - Los informes científicos en 40.000 folios presentados por el Centro para la Seguridad Alimentaria, contra la FDA, y contra los peligros de los alimentos-MG y la falta de dispositivo de control científico.
  - Varios casos que, como en la Klesbiella planticola, tuvieron que ser detectados por investigadores independientes. No es válida la presunción de credibilidad de las determinaciones y licencias concedidas por la FDA.

b) Tampoco tienen presunción de credibilidad los asertos expresados en base a investigaciones propias, o bien de investigadores académicos sujetos por "contratos de confidencialidad": investigaciones sesgadas, orientadas en buscar únicamente similitudes; no investigar lo que no interesa, y ocultar resultados adversos.

c) Actualmente se está procediendo a una revisión de las licencias concedidas en la sección de medicamentos ante casos como los debidos a los inhibidores de la proteína Cox-2 a los que se atribuyen por las organizaciones sanitarias de EEUU más de 60.000 muertos y de 130.000 personas gravemente afectadas por infartos y otras a patologías cardiovasculares.

Esta revisión se hace imprescindible en el sector de cultivos-MG tanto más cuando los efectos potenciales no afectan exclusivamente a los pacientes a los que se ha administrado el tratamiento sino a la generalidad e la población así como a las generaciones futuras ya que, a diferencia de los medicamentos, la contaminación genética se multiplica y reproduce.

#### **4º) .- La argumentación científica de las notificaciones, se basa en premisas y fundamentos incompatibles con la realidad de los conocimientos actuales en Genómica .**

**a).- Consideración del genoma según el "determinismo genético", junto al desprecio por el "genoma silencioso".** Esta concepción está rebasada:

- El genoma es, en si mismo, un ecosistema complejo con múltiples interacciones entre los genes, tanto simultáneas como en cascada y abundantes bucles; todo ello en interrelación con las condiciones del medio celular, el ambiente interno intercelular y el medio ambiente externo.
- Genoma fluido (K.W.Ho). La expresión de los genes sufre modificaciones y ajustes según las condiciones fisiológicas y ambientales. Los genes mutan, cambian de sitio, reordenan, replican, eliminan o insertan secuencias, e incluso las intercambian con otros genomas.
- Según el sistema de redes (F. Capra, 2002), hay que considerar la expresión de la "red epigenética". "La replicación de una célula no es sólo transmisión del ADN celular y del ADN bacteriano simbiótico; también es la transmisión del conjunto de enzimas, orgánulos, sistema endomembranoso, etc., es decir, de toda la red celular autopoiesica, en la que se puede diferenciar, conceptualmente, la red genómica y la red metabólica. El estudio solo puede intentar abordarse por las "matemáticas de la complejidad (Goodwin, 2000).
- El despreciado "ADN basura", que ejecuta funciones importantes: los retrotransposones (que ocupan más de un tercio del genoma humano y son muy abundantes en el del maíz), pueden regular la expresión de múltiples genes y alterar su función (B. Knoules, 2004). Las investigaciones acerca del genoma silencioso ha sido consideradas como uno de los avances científicos más importantes del año 2004.

**b).- Las proteínas no tienen el carácter específico atribuido en la notificación.** Recordamos:

- Basta, que se sustituya un solo aminoácido para que la proteína modifique su estructura y función (caso de la anemia falciforme, o de la fibrosis quística, debida a un solo cambio en una larga cadena de los aminoácidos, etc.).
- La misma proteína con idéntica fórmula química y secuencia, puede convertirse en letal al modificar su forma de plegamiento (proporción de hélices alfa y placas beta), además de poder infectar y reproducirse, quizás por combinación con algún o diversos elementos genéticos móviles (Manuelidis), como es el caso del príon de la EEB (Encefalitis Espongiforme Bovina). El plegamiento de la cromatina, mortal en niñas, el Parkinson, Alzheimer, etc.
- Las proteínas actúan agrupadas en consorcios que interaccionan entre si, los cuales se agrupan a su vez en redes de interacción más complejas, ya sea en interacción estable o limitada a determinadas fases del ciclo celular. Una misma proteína puede formar parte de varios consorcios de red interactiva.

Por lo tanto, consideramos inexcusable el cumplimiento del punto D-2a que se elude en la notificación: "no se ha considerado necesario repetir los análisis de Laboratorio para el híbrido, solo se ha comprobado que están presentes ambos eventos".

**5º).- Las notificación de liberaciones de cultivos-MG debería ajustarse al Anexo V-A en lugar del V-B.**

Aunque formalmente la transformación se realiza sobre una planta superior, el resultado final que ocurre indefectiblemente es que se transmiten a los microorganismos del suelo, agua y atmósfera los genes químicos y parásitos genéticos incluidos en las casetes insertadas. Este es precisamente el daño más grave y prácticamente irreversible que se deriva indefectiblemente de los cultivos-MG como está bien documentado, afectando a la microbiocenosis edafógena y patógena, ambas de vital importancia para la salud humana y de la fauna, y para la conservación de las constantes vitales de la Biosfera.

Parece necesario recordar:

- a) La gran afinidad de las bacterias para la cooperación y el intercambio de genes por TGH, así como para la incorporación a su genoma de parásitos genéticos, plásmidos,...; en la actualidad se está produciendo una oleada inusitada de TGH y recombinaciones víricas; el "comercio global bacteriano es extraordinariamente activo, pudiendo intercambiar en un solo día el 15% de sus genes y tener millones de progenie.
- b) Las bacterias, cuando se sienten amenazadas, dispersan su material genético en el entorno, siendo recogido por otras bacterias (McDonough & Braungert). El ADN desnudo es muy estable, pudiendo conservarse en el suelo al menos dos años, y también indefinidamente en reservorios de bacterias quiescentes en biofilmes que pueden reactivarse. El ADN desnudo puede penetrar a través de la piel, soportar el paso por el intestino, y penetrar en el torrente sanguíneo y en las células.
- c) Los organismos animales y vegetales son un conjunto de células propias más microorganismos. El cuerpo humano es una asociación (Biomo) de unos 70 billones de células, organizadas en diversos sistemas, órganos y tejidos, más un número mil veces mayor de microorganismos (bacterias, levaduras, gusanos microscópicos,...) en relación simbiótica, sinérgica o patógena. Ambos simbioses se transmiten señales mutuamente que modulan la expresión de sus genes respectivos (de su red epigenética).



d) Así, el ser humano se encuentra dentro del "caldo vital" de Medio Ambiente, y este se encuentra en el interior de nuestro organismo. La penetración e incorporación del medio bacteriano y la contaminación genética dentro del organismo humano o del ganado es mucho más rápida debido al uso de antibióticos que eliminan colonias bacterianas, quedando nichos ecológicos desocupados que son colonizados por las bacterias ambientales.

e) Se recuerda el caso del E.coli, que por adquisición de genes se convierte en la E.coli-0157h7, que es letal, además de multirresistente a los antibióticos por modificación de la beta lactasa; o el H. pilory (también omnipresente en el sistema digestivo como el E. coli) que se convierte en muy patógeno por modificación de la proteína Vac A.

f) Es preocupante que el promotor CaMV-35S está estrechamente relacionado con el virus de la hepatitis-B, y tiene secuencias análogas al del sida (Cummins, Cann, 97).

g) A diferencia Del CaMV natural, el CaMV-35S es activo en bacterias como el E. coli, siendo polivalente, por lo que puede infectar a mono y dicotiledóneas, algas, levaduras, coníferas,...

h) La transformación de una bacteria puede convertirla en letal sin que se haya modificado su patogenicidad específica para el hombre, por **mecanismos indirectos imprevisibles en la investigación clínica humana:**

Una bacteria, la Yersinia, se convirtió en la Yersinia pestis (causante de la peste bubónica que diezmó a la población europea en el Siglo XIV) por la adquisición casual de un plásmido con el gen que codifica la proteína Ymt (Yersinia murine toxin) que permite, a través de complicados procesos, la supervivencia de la Yersinia en el tracto digestivo de cierta pulga de la rata (Xenopsylla cheopis), cuya picadura al hombre permite su introducción dentro del torrente sanguíneo, donde no es eliminada como ocurría cuando llegaba normalmente por vía digestiva: es letal sin ningún incremento de su patogenicidad, sino por aparecer una nueva vía de penetración dentro del organismo. Las bacterias modificadas genéticamente pueden encontrar nuevas vías de penetración o actuación en el organismo de forma impredecible, a través de alguna de las innumerables especies de ácaros omnipresentes en todos los hogares.

**En conclusión:** una planta-MG no puede ser considerada como un apacible organismo inmóvil, sujeto por sus raíces: la batería de casetes introducida portando virus y plásmidos potenciados, la convierten en una potencial bomba biológica que puede reconvertir patógenos y facilitar el salto hasta otras especies salvando la "barrera entre especies". Como afirman varios científicos, los cultivos-MG "mas que campos de cultivo representan una grave infección vírica (Bardocz, 2001) .

El problema no se reduce a una planta modificada, sino a la consecuente liberación en el ambiente de los transgenes contenidos en las casetes transformadoras insertas en la planta transgénica, y de los elementos genéticos infectivos potenciados insertados también en la planta.

Los efectos de la contaminación genética se pueden transmitir a varios kilómetros de la planta-MG de origen:

- Arrastre de polen transgénico por turbulencias de viento.
- Arrastre del polen por los insectos polinizadores, incluso se puede propagar por aves migratorias.
- Arrastre de polen semillas o frutos transgénicos por las corrientes de agua superficiales.
- Transferencia de contaminación genética a los organismos del suelo, de la atmósfera o de las aguas superficiales o subterráneas.
- La contaminación genética puede mantenerse por tiempo indefinido en biofilms quiescentes.

### **Anexo III. Documento 3º**

#### **Horizontal Gene Transfer - The Hidden Hazards of Genetic Engineering**

Source: Institute of Science in Society .Publication date: August 18, 2000 .

Posting date: March 22, 2005. Dr. Mae Wan Ho.

#### **Abstract**

Genetic engineering involves designing artificial constructs to cross species barriers and to invade genomes. In other words, it enhances horizontal gene transfer – the direct transfer of genetic material to unrelated species. The artificial constructs or transgenic DNA typically contain genetic material from bacteria, viruses and other genetic parasites that cause diseases as well as antibiotic resistance genes that make infectious diseases untreatable. Horizontal transfer of transgenic DNA has the potential, among other things, to create new viruses and bacteria that cause diseases and spread drug and antibiotic resistance genes among pathogens. There is an urgent need to establish effective regulatory oversight to prevent the escape and release of these dangerous constructs into the environment, and to consider whether some of the most dangerous experiments should be allowed to continue at all.

Key words: antibiotic resistance genes, dormant viruses, CaMV promoter, cancer, naked DNA, transgenic DNA,

#### **Transgenic pollen and baby bees**

Prof. Hans-Hinrich Kaatz from the University of Jena, is reported to have new evidence, as yet unpublished, that genes engineered into transgenic plants have transferred via pollen to bacteria and yeasts living in the gut of bee larvae(1).

If Prof. Kaatz' claim can be substantiated, it indicates that the new genes and gene-constructs introduced into transgenic crops and other transgenic organisms can spread, not just by ordinary cross-pollination or cross-breeding to closely related species, but by the genes and gene-constructs invading the genomes (the totality of the organisms' own genetic material) of completely unrelated species, including the microorganisms living in the gut of animals eating transgenic material.

This finding is not unexpected. Some scientists have been drawing attention to this possibility recently(2), but the warnings actually date back to the mid-1970s when genetic engineering began. Hundreds of scientists around the world are now demanding a moratorium on all environmental releases of transgenic organisms on grounds of safety(3), and horizontal gene transfer is one of the major considerations.

Some of us have argued that the hazards of 'horizontal' gene transfer to unrelated species are inherent to genetic engineering(4). The genes and gene-constructs created in genetic engineering have never existed in billions of years of evolution. They consist of genetic material originating from bacteria, viruses and other genetic parasites that cause diseases and spread drug and antibiotic resistance genes. They are designed to cross all species barriers and to invade genomes. The spread of such genes and gene-constructs have the potential to make infectious diseases untreatable and to create new viruses and bacteria that cause diseases. Horizontal gene transfer may spread transgenes to the entire biosphere

Horizontal gene transfer is the transfer of genetic material between cells or genomes belonging to unrelated species, by processes other than usual reproduction. In the usual process of reproduction, genes are transferred vertically from parent to offspring; and such a process can occur only within a species or between closely related species.

Bacteria have been known to exchange genes across species barriers in nature. There are three ways in which this is accomplished. In conjugation, genetic material is passed between cells in contact; in transduction, genetic material is carried from one cell to another by infectious viruses; and in transformation, the genetic material is taken up directly by the cell from its environment. For horizontal gene transfer to be successful, the foreign genetic material must become integrated into the cell's genome, or become stably maintained in the recipient cell in some other

form. In most cases, foreign genetic material that enters a cell by accident, especially if it is from another species, will be broken down before it can incorporate into the genome. Under certain ecological conditions which are still poorly understood, foreign genetic material escapes being broken down and become incorporated in the genome. For example, heat shock and pollutants such as heavy metals can favor horizontal gene transfer; and the presence of antibiotics can increase the frequency of horizontal gene transfer 10 to 10 000 fold(5).

While horizontal gene transfer is well-known among bacteria, it is only within the past 10 years that its occurrence has become recognized among higher plants and animals(6). The scope for horizontal gene transfer is essentially the entire biosphere, with bacteria and viruses serving both as intermediaries for gene trafficking and as reservoirs for gene multiplication and recombination (the process of making new combinations of genetic material (7)).

There are many potential routes for horizontal gene transfer to plants and animals. Transduction is expected to be a main route as there are many viruses which infect plants and animals. Recent research in gene therapy indicates that transformation is potentially very important for cells of mammals including human beings. A great variety of 'naked' genetic material are readily taken up by all kinds of cells, simply as the result of being applied in solution to the eye, or rubbed into the skin, injected, inhaled or swallowed. In many cases, the foreign gene constructs become incorporated into the genome(8).

Direct transformation may not be as important for plant cells, which generally have a protective cell wall. But soil bacteria belonging to the genus *Agrobacterium* are able to transfer the T (tumour) segment of its Tumour-inducing (Ti) plasmid (see below) into plant cells in a process resembling conjugation. This T-DNA is widely exploited as a gene transfer vehicle in plant genetic engineering (see below). Foreign genetic material can also be introduced into plant and animal cells by insects and arthropods with sharp mouthparts. In addition, bacterial pathogens which enter plant and animal cells may take up foreign genetic material and carry it into the cells, thus serving vectors for horizontal gene transfer(9). There are almost no barriers preventing the entry of foreign genetic material into the cells of probably any species on earth. The most important barriers to horizontal gene transfer operate after the foreign genetic material has entered the cell(10).

Most foreign genetic material, such as those present in ordinary food, will be broken down to generate energy and building-blocks for growth and repair. There are many enzymes which break down foreign genetic material; and in the event that the foreign genetic material is incorporated into the genome, chemical modification can still put it out of action and eliminate it.

However, viruses and other genetic parasites such as plasmids and transposons, have special genetic signals and probably overall structure to escape being broken down. A virus consists of genetic material generally wrapped in a protein coat. It sheds its overcoat on entering a cell and can either hi-jack the cell to make many more copies of itself, or it can jump directly into the cell's genome. Plasmids are pieces of 'free', usually circular, genetic material that can be indefinitely maintained in the cell separately from the cell's genome. Transposons, or 'jumping genes', are blocks of genetic material which have the ability to jump in and out of genomes, with or without multiplying themselves in the process. They can also land in plasmids and be propagated there. Genes hitch-hiking in genetic parasites, ie, viruses, plasmids and transposons, therefore, have a greater probability of being successfully transferred into cells and genomes. Genetic parasites are vectors for horizontal gene transfer.

Natural genetic parasites are limited by species barriers, so for example, pig viruses will infect pigs, but not human beings, and cauliflower viruses will not attack tomatoes. It is the protein coat of the virus that determines host specificity, which is why naked viral genomes (the genetic material stripped of the coat) have generally been found to have a wider host range than the intact virus(11). Similarly, the signals for propagating different plasmids and transposons are usually specific to a limited range of host species, although there are exceptions.

As more and more genomes have been sequenced, it is becoming apparent that gene trafficking or horizontal gene transfer has played an important role in the evolution of all species(12). However, it is also clear that horizontal gene trafficking is regulated by internal constraints in the organisms in response to ecological conditions(13).

Genetic engineering is unregulated horizontal gene transfer

Genetic engineering is a collection of laboratory techniques used to isolate and combine the genetic material of any species, and then to multiply the constructs in convenient cultures of bacteria and viruses in the laboratory. Most of all, the techniques allow genetic material to be transferred between species that would never interbreed in nature. That is how human genes can be transferred into pig, sheep, fish and bacteria; and spider silk genes end up in goats. Completely new, exotic genes are also being introduced into food and other crops.

In order to overcome natural species barriers limiting gene transfer and maintenance, genetic engineers have made a huge variety of artificial vectors (carriers of genes) by combining parts of the most infectious natural vectors – viruses, plasmids and transposons - from different sources. These artificial vectors generally have their disease-causing functions removed or disabled, but are designed to cross wide species barriers, so the same vector may now transfer, say, human genes spliced into the vector, to the genomes of all other mammals, or of plants. Artificial vectors greatly enhance horizontal gene transfer (see Box 1).(14)

Although different classes of vectors are distinguishable on the basis of the main-frame genetic material, practically every one of them is chimaeric, being composed of genetic material originating from the genetic parasites of many different species of bacteria, animals and plants. Important chimaeric ‘shuttle’ vectors enable genes to be multiplied in the bacterium *E. coli* and transferred into species in every other Kingdom of plants and animals. Simply by creating such a vast variety of promiscuous gene transfer vectors, genetic engineering biotechnology has effectively opened up highways for horizontal gene transfer and recombination, where previously the process was tightly regulated, with restricted access through narrow, tortuous footpaths. These gene transfer highways connect species in every Domain and Kingdom with the microbial populations via the universal mixing vessel used in genetic engineering, *E. coli*. What makes it worse is that there is currently still no legislation in any country to prevent the escape and release of most artificial vectors and other artificial constructs into the environment (15).

#### **What are the hazards of horizontal gene transfer?**

Most artificial vectors are either derived from viruses or have viral genes in them, and are designed to cross species barriers and invade genomes. They have the potential to recombine with the genetic material of other viruses to generate new infectious viruses that cross species barriers. Such viruses have been appearing at alarming frequencies. The antibiotic resistance genes carried by artificial vectors can also spread to bacterial pathogens. Has the growth of commercial-scale genetic engineering biotechnology contributed to the resurgence of drug and antibiotic infectious diseases within the past 25 years (16)? There is already overwhelming evidence that horizontal gene transfer and recombination have been responsible for creating new viral and bacterial pathogens and for spreading drug and antibiotic resistance among the pathogens. One way that new viral pathogens may be created is through recombination with dormant, inactive or inactivated viral genetic material that are in all genomes, plants and animals without exception. Recombination between external and resident, dormant viruses have been implicated in many animal cancers (17).

As stated earlier, the cells of all species including our own can take up foreign genetic material. Artificial constructs designed to invade genomes may well invade our own. These insertions may lead to inappropriate inactivation or activation of genes (insertion mutagenesis), some of which may lead to cancer (insertion carcinogenesis)(18). The hazards of horizontal gene transfer are summarized in Box 2.

#### **Transgenic DNA may be more likely to transfer horizontally than non-transgenic DNA**

Both the artificial vectors used in genetic engineering and the genes transferred to make transgenic organisms are predominantly from viruses and bacteria associated with diseases, and these are being brought together in combinations that have never existed in billions of years of evolution.

Genes are never transferred alone. They are transferred in unit-constructs, known as an ‘expression cassettes’. Each gene has to be accompanied by a special piece of genetic material, the promoter, which signals the cell to turn the gene on, ie, to transcribe the DNA gene sequence into RNA. At the end of the gene there has to be another signal, a terminator, to end the transcription and to mark the RNA, so it can be further processed and translated into protein. The simplest expression cassette looks like this:

Promoter --- -- gene ----- terminator

Typically, each bit of the construct: promoter, gene and terminator, is from a different source. The gene itself may also be a composite of bits from different sources. Several expression cassettes are usually linked in series, or 'stacked' in the final construct. At least one of the expression cassettes will be that of an antibiotic resistance marker gene to enable cells that have taken up the foreign construct to be selected with antibiotics. The antibiotic resistance gene cassette will often remain in the transgenic organism.

The most commonly used promoters are from viruses associated with serious diseases. The reason is that such viral promoters give continuous over-expression of genes placed under their control. The same basic construct is used in all applications of genetic engineering, whether in agriculture or in medicine, and the same hazards are involved. There are reasons to believe that transgenic DNA is much more likely to spread horizontal than the organisms' own DNA (see Box 3) (19).

### **Additional hazards from viral promoters**

We have recently drawn attention to additional hazards associated with the promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV) most widely used in agriculture (23). It is in practically all transgenic plants already commercialized or undergoing field trials, as well as a high proportion of transgenic plants under development, including the much acclaimed 'golden rice' (24).

CaMV is closely related to human hepatitis B virus, and less so, to retroviruses such as the AIDS virus (25). Although the intact virus itself is infectious only for cruciferae plants, its promoter is promiscuous in function, and is active in all higher plants, in algae, yeast, and *E. coli* (26), as well as frog and human cell systems (27). Like all promoters of viruses and of cellular genes, it has a modular structure, with parts common to, and interchangeable with promoters of other plant and animal viruses. It has a recombination hotspot, flanked by multiple motifs involved in recombination, similar to other recombination hotspots including the borders of the *Agrobacterium* T DNA vector most frequently used in making transgenic plants. The suspected mechanism of recombination requires little or no DNA sequence homologies. Finally, viral genes incorporated into transgenic plants have been found to recombine with infecting viruses to generate new viruses (28). In some cases, the recombinant viruses are more infectious than the original.

Proviral sequences – generally inactive copies of viral genomes - are present in all plant and animal genomes, and as all viral promoters are modular, and have at least one module – the TATA box - in common, if not more. It is not inconceivable that the CaMV 35S promoter in transgenic constructs can reactivate dormant viruses or generate new viruses by recombination. The CaMV 35S promoter has been joined artificially to copies of a wide range of viral genomes, and infectious viruses produced in the laboratory (29). There is also evidence that proviral sequence in the genome can be reactivated (30).

These considerations are especially relevant in the light of recent findings that certain transgenic potatoes - containing the CaMV 35S promoter and transformed with *Agrobacterium* T-DNA - may be unsafe for young rats, and that a significant part of the effects may be due to "the construct or the genetic transformation (or both) (31)" The authors also report an increase in lymphocytes in the intestinal wall, which is a non-specific sign of viral infection (32).  
Evidence for horizontal transfer of transgenic DNA

It is often argued that transgenic DNA, once incorporated into the transgenic organism, will be just as stable as the organism's own DNA. But there is both direct and indirect evidence against this supposition. Transgenic DNA is more likely to spread, and has been found to spread by horizontal gene transfer.

Transgenic lines are notoriously unstable and often do not breed true (33). There is a paucity of molecular data documenting the structural stability of the transgenic DNA, both in terms of its site of insertion in the genome and its arrangement of genes, in successive generations. Instead, transgenes may be silenced in subsequent generations or lost altogether (34).

A herbicide-tolerance gene, introduced into *Arabidopsis* by means of a vector, was found to be up to 30 times more likely to escape and spread than the same gene obtained by mutagenesis (35). One way this may happen is by secondary horizontal gene transfer via insects visiting the plants for pollen and nectar (36). The reported finding that pollen can transfer transgenic DNA to bacteria in the gut of bee larvae is relevant here.

Secondary horizontal transfer of transgenes and antibiotic resistant marker genes from genetically engineered crop-plants into soil bacteria and fungi have been documented in the laboratory. Transfer to fungi was achieved simply by co-cultivation (37), while transfer to bacteria has been achieved by both re-isolated transgenic DNA or total transgenic plant DNA (38). Successful transfers of a kanamycin resistance marker gene to the soil bacterium *Acinetobacter* were obtained using total DNA extracted from homogenized plant leaf from a range of transgenic plants: *Solanum tuberosum* (potato), *Nicotiana tabacum* (tobacco), *Beta vulgaris* (sugar beet), *Brassica napus* (oil-seed rape) and *Lycopersicon esculentum* (tomato) (39). It is estimated that about 2500 copies of the kanamycin resistance genes (from the same number of plant cells) is sufficient to successfully transform one bacterium, despite the fact that there is six million-fold excess of plant DNA present. A single plant with say, 2.5 trillion cells, would be sufficient to transform one billion bacteria.

Despite the misleading title in one of the publications,(40) a high gene transfer frequency of  $5.8 \times 10^{-2}$  per recipient bacterium was demonstrated under optimum conditions. But the authors then proceeded to calculate an extremely low gene transfer frequency of  $2.0 \times 10^{-17}$  under extrapolated "natural conditions", assuming that different factors acted independently. The natural conditions, however, are largely unknown and unpredictable, and even by the authors' own admission, synergistic effects cannot be ruled out. Free transgenic DNA is bound to be readily available in the rhizosphere around the plant roots, which is also an 'environmental hotspot' for gene transfer (41). Other workers have found evidence of horizontal transfer of kanamycin resistance from transgenic DNA to *Acinetobacter*, and positive results were obtained using just 100ml of plant-leaf homogenate (42).

Defenders of the biotech industry still insist that just because horizontal gene transfer occurs in the laboratory does not mean it can occur in nature. However, there is already evidence suggesting it can occur in nature. First of all, genetic material released from dead and live cells, is now found to persist in all environments; and not rapidly broken down as previously supposed. It sticks to clay, sand and humic acid particles and retains the ability to infect (transform) a range of micro-organisms in the soil (43). The transformation of bacteria in the soil by DNA adsorbed to clay sand and humic acid has been confirmed in microcosm experiments (44).

Researchers in Germany began a series of experiments in 1993 to monitor field releases of transgenic rhizomania-resistant sugar beet (*Beta vulgaris*), containing the marker gene for kanamycin resistance, for persistence of transgenic DNA and of horizontal gene transfer of transgenic DNA into soil bacteria (45). It is the first such experiment to be carried out; after tens of thousands of field releases and tens of millions of hectares have been planted with transgenic crops. It will be useful to review their findings in detail.

Transgenic DNA was found to persist in the soil for up to two years after the transgenic crop was planted. Though they did not comment on it, the data showed that the proportion of kanamycin resistant bacteria in the soil increased significantly between 1.5 and 2 years. Could it be due to horizontal transfer of antibiotic resistance marker gene in the transgenic DNA? Although none of 4000 colonies of soil bacteria isolated – a rather small number - was found to have taken up transgenic DNA by the probes available, two out of seven samples of total bacterial DNA yielded positive results after 18 months. This suggests that horizontal gene transfer may have taken place, but the specific bacteria which have taken up the transgenic DNA cannot be isolated as colonies. That is not surprising as less than 1% of all the bacteria in the soil are culturable. The authors were careful not to rule out transgenic DNA being adsorbed to the surface of bacteria rather than being transferred into the bacteria.

The researchers also carried out microcosm experiments to which total transgenic sugar-beet DNA was added to non-sterile soil with its natural complement of microorganisms. The intensity of the signal for transgenic DNA decreased during the first days and subsequently increased. This may be interpreted as a sign that the transgenic DNA has been taken up by bacteria and become amplified as a result.

In parallel, soil samples were plated and the total bacterial lawn allowed to grow for 4 days, after which DNA was extracted. Several positive signals were found, "which might indicate uptake of transgenic DNA by competent bacteria."

The authors were cautious not to claim conclusive results simply because the specific bacteria carrying the transgenic DNA sequences were not isolated. The results do show, however, that horizontal gene transfer may have taken place both in the field and in the soil microcosm.

DNA is not broken down sufficiently rapidly in the gut either, which is why transfer of transgenic DNA to microorganisms in the gut of bee larvae would not be surprising. A genetically engineered plasmid was found to have a 6 to 25% survival after 60 min. of exposure to human saliva. The partially degraded plasmid DNA was capable of transforming *Streptococcus gordonii*, one of the bacteria that normally live in the human mouth and pharynx. The frequency of transformation dropped exponentially with time of exposure to saliva, but it was still detectable after 10 minutes. Human saliva actually contains factors that promote competence of resident bacteria to become transformed by DNA (46).

Viral DNA fed to mice is found to reach white blood cells, spleen and liver cells via the intestinal wall, to become incorporated into the mouse cell genome (47). When fed to pregnant mice, the viral DNA ends up in cells of the fetuses and the new born animals, suggesting that it has gone through the placenta as well (48). The authors remark that "The consequences of foreign DNA uptake for mutagenesis and oncogenesis have not yet been investigated (49)." As already mentioned, recent experiments in gene therapy leave little doubt that naked nucleic acid constructs can readily enter mammalian cells and in many cases become incorporated into the cell's genome.

Conclusion

Horizontal gene transfer is an established phenomenon. It has taken place in our evolutionary past and is continuing today. All the signs are that natural horizontal gene transfer is a regulated process, limited by species barriers and by mechanisms that break down and inactivate foreign genetic material. Unfortunately, genetic engineering has created a huge variety of artificial constructs designed to cross all species barriers and to invade essentially all genomes. Although the basic constructs are the same for all applications, some of the most dangerous may be coming from the waste disposal of contained users of transgenic organisms(50). These will include constructs containing cancer genes from viruses and cells from laboratories researching and developing cancer and cancer drugs, virulence genes from bacteria and viruses in pathology labs. In short, the biosphere is being exposed to all kinds of novel constructs and gene combinations that did not previously exist in nature, and may never have come into being but for genetic engineering.

There is an urgent need to establish effective regulatory oversight, in the first instance, to prevent the escape and release of these dangerous constructs into the environment, and then to consider whether some of the most dangerous experiments should be allowed to continue at all.

-----  
Box 1

Artificial vectors enhance horizontal gene transfer

\* They are derived from natural genetic parasites that mediate horizontal gene transfer most effectively.

\* Their highly chimaeric nature means that they have sequence homologies (similarities) to DNA from viral pathogens, plasmids and transposons of multiple species across Kingdoms. This will facilitate widespread horizontal gene transfer and recombination.

\* They routinely contain antibiotic resistance marker genes which enhance their successful horizontal transfer in the presence of antibiotics, either intentionally applied, or present as xenobiotic in the environment. Antibiotics are known to enhance horizontal gene transfer between 10 to 10 000 fold.

\* They often have 'origins of replication' and 'transfer sequences', signals that facilitate

horizontal gene transfer and maintenance in cells to which they are transferred.

\* Chimaeric vectors are well-known to be structurally unstable, ie, they have a tendency to break and join up incorrectly or with other DNA, and this will increase the propensity for horizontal gene transfer and recombination.

\* They are designed to invade genomes, to overcome mechanisms that breakdown or disable foreign DNA and hence will increase the probability of horizontal transfer.

---

#### Box 2

Potential hazards of horizontal gene transfer from genetic engineering

- \* Generation of new cross-species viruses that cause disease
  - \* Generation of new bacteria that cause diseases
  - \* Spreading drug and antibiotic resistance genes among the viral and bacterial pathogens, making infections untreatable
  - \* Random insertion into genomes of cells resulting in harmful effects including cancer
  - \* Reactivation of dormant viruses, present in all cells and genomes, which may cause diseases
  - \* Spreading new genes and gene constructs that have never existed
  - \* Multiplication of ecological impacts due to all of the above.
- 

#### Box 3

Reasons to suspect that transgenic DNA may be more likely to spread horizontally than non-transgenic DNA

- \* Artificial constructs and vectors are designed to be invasive to foreign genomes and overcome species barriers.
  - \* All artificial gene-constructs are structurally unstable (20), and hence prone to recombine and transfer horizontally.
  - \* The mechanisms enabling foreign genes to insert into the genome also enable them to jump out again, to re-insert at another site, or to another genome.
  - \* The integration sites of most commonly used artificial vectors for transferring genes are 'recombination hotspots', and so have an increased propensity to transfer horizontally.
  - \* Viral promoters, such as that from the cauliflower mosaic virus, widely used to make transgenes over-express, contain recombination hotspots (21), and will therefore further enhance horizontal gene transfer.
  - \* The metabolic stress on the host organism due to the continuous over expression of transgenes may also contribute to the instability of the insert (22).
  - \* The foreign gene-constructs and the vectors into which they are spliced, are typically mosaics of DNA sequences from numerous species and their genetic parasites; that means they will have sequence homologies with the genetic material of many species and their genetic parasites, thus facilitating wide-ranging horizontal gene transfer and recombination.
- 

#### References

1. Thanks to Dr. Beatrix Tappeser, Institute for Applied Ecology, Postfach 6226, D-79038, Freiburg, for this information. See also Barnett, A. (2000). GM genes 'jump species barrier' The Observer, May 28, 2000.
2. See Stephenson, J.R., and Warnes, A. (1996). Release of genetically-modified microorganisms into the environment. *J. Chem. Tech. Biotech.* 65, 5-16; Harding, K. (1996). The potential for horizontal gene transfer within the environment. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* July/August, 31-35; Ho, M.W. (1996). Are current transgenic technologies safe? In Virgin, I. and Frederick R.J., eds. *Biosafety Capacity Building*, pp. 75-80, Stockholm Environment Institute, Stockholm; Traavik, T. (1999). Too Early May be Too Late, Report for the Directorate for Nature Research, Trondheim,



Norway.

3. See [www.i-sis.org.uk](http://www.i-sis.org.uk)

4. See Ho, M.W. (1998, 1999). Genetic Engineering Dream or Nightmare? The Brave New World of Bad Science and Big Business. Gateway, Gill & Macmillan, Dublin; Ho, M.W., Traavik, T., Olsvik, R., Tappeser, B., Howard, V., von Weizsacker, C. and McGavin, G. (1998). Gene Technology and Gene Ecology of Infectious Diseases. *Microbial Ecology in Health and Disease* 10, 33-59.

5. See Ho et al, 1998 (note 4) and references therein.

6. See Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.

7. See Ho, 1998, 1999 (note 4; Ho, et al, 1998 (note 4).

8. See Ho, M.W., Ryan, A., Cummins, J. and Traavik, T. (2000a). Unregulated Hazards: 'Naked' and 'Free' Nucleic Acids, ISIS & TWN Report, London and Penang. [www.i-sis.org.uk](http://www.i-sis.org.uk).

9. Grillot-Courvalin, C., Goussand, S., Huetz, F., Ojcius, D.M. and Courvalin, P. (1998). Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nature Biotechnology* 16, 862-866.

10. See Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K. and van Elsas, J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event? *FEMS Microbiology Reviews* 22, 79-103.

11. See Ho et al, 2000a (note 9)

12. See Doolittle, W.F. (1999). Lateral genomics. *Trends Cell Biol* 9, 5-8.

13. See Jain, R., Rivera, M.C. and Lake, J.A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3801-3806; Shapiro, J. (1997).

Genome organization, natural genetic engineering and adaptive mutation. *TIG* 13, 98-104; Ho, 1998, 1999 (note 4).

14. See Ho et al, 1998 (note 4) for references.

15. See Ho et al, 2000 (note 8)

16. Reviewed in Ho et al, 1998 (note 4).

17. Reviewed in Ho, 1998, 1999 (note 4) Chapter on "The mutable gene and the human condition".

18. See Ho et al, 2000 (note 9) and references therein.

19. See Ho, M.W. (1999). Special Safety Concerns of Transgenic Agriculture and Related Issues Briefing Paper for Minister of State for the Environment, The Rt Hon Michael Meacher [www.i-sis.org.uk](http://www.i-sis.org.uk)

20. See Old, R.W. and Primrose, S.B. (1994). Principles of Gene Manipulation, 5th ed. Blackwell Science, Oxford; Kumpatla, S.P., Chandrasekharan, M.B., Luer, L.M., Li, G. and Hall, T.c. (1998). Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends in Plant Sciences* 3, 96-104.

21. See Kohli, A., Griffiths, S., Palacios, N., Twyman, R.M., Vain, P., Laurie, D.A. and Christou, P. (1999). Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *The Plant Journal* 17, 591-601.

22. Finnegan, J. and McElroy, D. (1994). Transgene inactivation, plants fight back! *Bio/Technology* 12, 883-8.

23. Ho, M.W., Ryan, A. and Cummins, J. (1999). The cauliflower mosaic viral promoter – a recipe for disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease* 11, 194-197; Ho, M.W., Ryan, A. and Cummins, J. (2000). Hazards of transgenic plants containing the cauliflower mosaic viral promoter. *Microbial Ecology in Health and Disease* (in press).

24. Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. and Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A (-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287, 303-305; see also Ho, M.W. (2000). The Golden Rice – An Exercise in How Not to Do Science. ISIS Sustainable Science Audit #1 [www.i-sis.org.uk](http://www.i-sis.org.uk)

25. Xiong, Y. and Eickbush, T. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon the reverse transcriptase sequences. *The Embo Journal* 9, 3363-72.

26. Assaf, F.F. and Signer, E.R. (1990). Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 223, 517-20.

27. Ballas, N., Broido, S., Soreq, H., and Loyter, A. (1989). Efficient functioning of plant promoters and poly(A) sites in *Xenopus* oocytes *Nucl Acids Res* 17, 7891-903; Burke, C, Yu X.B., Marchitelli, L., Davis, E.A., Ackerman, S. (1990). Transcription factor IIA of wheat and human function similarly with plant and animal viral promoters. *Nucleic Acids Res* 18, 3611-20.

28. Reviewed in Ho, et al, 2000 (note 24).

29. Maiss, E., Timpe, U., and Briske-Rode, A. (1992). Infectious in vivo transcripts of a plumpox potyvirus full length c-DNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35-S RNA promoter *J.*

- Gen. Virol. 73, 709-13; Meyer, M and Dessens, J. (1997). 35S promoter driven cDNA of barley mild mosaic virus RNA-1 and RNA-2 are infectious in barley plants. J. Gen. Virol. 78, 147-51.
30. Ndowora, T., Dahal, G., LaFleur, D., Harper, G., Hull, R., Olszerski, N.E. and Lockhart, B. (1999). Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255, 214-20.
31. Ewen S, Pusztai A. Effect of Diets Containing Genetically Modified Potatoes Expressing *Galanthus nivalis* Lectin on Rat Small Intestine. *The Lancet* 1999, 354: 1353-1354.
32. Arpad Pusztai, personal communication.
33. Reviewed by Pawlowski, W.P. and Somers, D.A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology* 6, 17-30; See also Ho, 1998, 1999 (note 4) Chapter "Perils amid promises of genetically modified food".
34. See Pawlowski and Somers, 1996 (note 35), also Srivastava V, Anderson OD, Ow DW. Single-copy Transgenic Wheat Generated through the Resolution of Complex Integration Patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 11117-11121.
35. Bergelson, J., Purrington, C.B. and Wichmann, G. (1998). Promiscuity in transgenic plants. *Nature* 395, 25.
36. This possibility was not considered by the authors Bergelson et al, 1998 (note 35), although when I put this possibility to the first author by e-mail, she replied that it could not be ruled out.
37. Hoffman, T., Golz, C. & Schieder, O. (1994). Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Current Genetics* 27: 70-76.
38. Schluter, K., Futterer, J. & Potrykus, I. (1995). Horizontal gene-transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia-chrysanthem*) occurs, if at all, at an extremely low-frequency. *Bio/Techology* 13: 1094-1098; Gebhard, F. and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1550-4.
39. De Vries, J. and Wackernagel, W. (1998). Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.* 257, 606-13.
40. Schlutter et al, 1995 ( note 38).
41. Timms-Wilson, T.M., Lilley, A.K. and Bailey, M.J. (1999). A Review of Gene Transfer from Genetically Modified Micro-organisms. Report to UK Health and Safety Executive.
42. Gebhard and Smalla, 1998 (note 38).
43. Reviewed by Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
44. Paget, E. and Simonet, P. (1997). Development of engineered genomic DNA to monitor the natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil-like microcosms. *Can. J. Microbiol.* 43, 78-84.
45. Gebhard, F. and Smalla, K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 261-272.
46. Mercer, D.K., Scott, K.P., Bruce-Johnson, W.A. Glover, L.A. and Flint, H.J. (1999). Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 6-10.
47. Schubbert, R., Rentz, D., Schmitz, B. and Doerfler, W. (1997). Foreign (M13 DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 961-6.
48. Doerfler, W. and Schubbert, R. (1998). Uptake of foreign DNA from the environment: the gastrointestinal tract and the placenta as portals of entry, *Wien Klin Wochenschr.* 110, 40-44.
49. Doerfler and Schubbert, 1998, (note 48), p. 40.
50. See Ho, et al, 1998 (note 4); Ho et al, 2000 (note 8).

# Cauliflower Mosaic Viral Promoter - A Recipe for Disaster?

Mae-Wan Ho<sup>1</sup>, Angela Ryan<sup>1</sup> and Joe Cummins<sup>2</sup>

From the <sup>1</sup>Biology Department Open University, Walton Hall Milton Keynes, MK7 6AA, UK. <sup>2</sup>Dept. of Plant Sciences, University of Western Ontario, Ontario, Canada.

Correspondence to: Mae-Wan Ho, Biology Department Open University, Walton Hall Milton Keynes, MK7 6AA, UK. Tel: 44 1908 65 3113; Fax.: 44 1908 654167; E-mail: m.w.ho@open.ac.uk

Microbial Ecology in Health and Disease 1999; 11: 194–197

Concerns have been raised over the spread of transgenic DNA by horizontal gene transfer. One main factor determining the success of horizontal gene transfer is its tendency to recombine. This paper examines the safety implication of recent revelations on the recombination hotspot of the cauliflower mosaic viral (CaMV) promoter, which is in practically all current transgenic crops released commercially or undergoing field trials. As a precautionary measure, we strongly recommend that all transgenic crops containing CaMV 35S or similar promoters which are recombinogenic should be immediately withdrawn from commercial production or open field trials. All products derived from such crops containing transgenic DNA should also be immediately withdrawn from sale and from use for human consumption or animal feed.

The release of transgenic crops into the environment has raised concerns over the spread of transgenic DNA, not only by cross-pollination to related species, but especially by horizontal gene transfer to unrelated species (reviewed by Ho et al (1) and Traavik (2)). On account of the persistence of DNA in all environments, and the ability of practically all cells to take up 'naked' or free DNA, the success of horizontal gene transfer may depend largely on the nature of the DNA itself. New revelations concerning the CaMV recombination hotspot (3) have prompted us to consider the safety implications of the CaMV promoter. That is all the more urgent as CaMV promoter is in practically all transgenic crops already released commercially or undergoing field trials.

Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) is a pararetrovirus of crucifer plants. The genome is an 8-kbp double-stranded circular DNA with three single strand gaps. Two major RNA transcripts (19S and 35S) and six large open reading frames are encoded by the DNA. Transcription occurs from a nonintegrated, circular minichromosome in the nucleus of the plant cell, and virion DNA is synthesised in the cytoplasm by reverse transcription of the 35S RNA transcript (4, 5). Phylogenetically, CaMV belongs to a group of caulimoviruses most closely related to the hepadnaviruses of animals, which includes the human hepatitis B virus. The reverse transcriptase (RT) of CaMV, however, is most similar to that of retrotransposons belonging to the Gypsy group and also to that of retroviruses (6). This suggests that CaMV evolved subsequent to the horizontal

transfer of a retrotransposon to the cruciferae, either as the result of capture of RT gene by a pre-existing virus or by the transposable element acquiring additional genes to become a virus.

The CaMV promoter is a sequence of about 350 base-pairs upstream of the 35S transcript (–343 to +8, with Cap site at +1), about 250 basepairs of which overlap with the 3' end of gene VI, the last of the six large open reading frames. There are three domains in the promoter, the core promoter containing the TATA box (–46 to +8), and two other major domains with enhancer functions. Region A (–90 to –46) is mainly required for expression in roots, and region B (–343 to –90) for expression in leaves (see (7, 8) and references therein). Subdomains of the B region (B1 to B5) can be recognised based on differential interactions with various transcription factors. However, the complete B region allows a more general constitutive expression than expected from the combinations of subdomains. This suggests that important sequence elements are at the interfaces of the subdomains, or that the combination of subdomains is not simply additive but results in qualitatively novel specificities.

The roles of the different 35S promoter domains in pathogenesis of CaMV have only been studied fairly recently (4, 9). These studies show that the loss of up to 40 amino acids from the 3' end of gene VI (which overlaps with the 35S promoter) had no effect on pathogenesis whereas further truncation into a putative zinc finger region was fatal to the virus. Removing the TATA box

also abolished infectivity. However, upstream deletions within the enhancer region between  $-207$  and  $-56$  were tolerated even though complete removal of this fragment caused loss of infectivity. Two separate enhancer domains for infectivity were identified,  $-207$  to  $-150$  and  $-95$  to  $-56$ , only one of which is necessary. The enhancer region could even work in reverse orientation. Foreign gene sequences could be inserted into deletion mutants, which may alter the infectious characteristics of the virus.

Various hybrid or combination promoters have been constructed from the CaMV 35S promoter which led to improved expression of transgenes: double 35S promoters (10), a hybrid containing the core 19S promoter from CaMV and the 35S upstream enhancers (11), and combination of CaMV 35S with mannopine synthase elements (12), or with *Adh1*- and *ocs*-promoter elements for expression in monocotyledons (13). These results emphasise the modularity and interchangeability of promoter elements (8), which have important implications for the safety of transgenic plants. It means, in effect, that recombination of the CaMV promoter elements with dormant, endogenous viruses may create new infectious viruses in all species to which the transgenic DNA is transferred.

Another factor which affects the safety of transgenic plants containing CaMV promoters and related constructs is that although CaMV itself infects only dicotyledons, its promoter is promiscuous; and functions efficiently in monocotyledons (14), in conifer cell lines (15), green algae (16), yeasts (17) and *E. coli* (18). The transfer of CaMV promoter to these other species could also give rise to unpredictable effects on gene expression, which may impact on the ecosystem as a whole.

It has been known for some time that recombination can occur between different CaMV viral strains in plants (19), between different homologous parts of an integrated CaMV viral sequence in transgenic plants (20) and between an integrated transgene and an infecting virus (21). Analysis of the junctions of recombination suggests that one of the recombination hotspots was at the 3' end of the 35S promoter, and was thought to be due primarily to template switching during reverse transcription. This kind of recombination depends on sequence homology between the recombining partners as well as the action of virally encoded reverse transcriptase, and is expected to have little impact on nonhomologous DNA belonging to other organisms. However, it was suspected that recombination may also occur between double-stranded DNA, as recombination junctions were found away from the initiation site of DNA synthesis (where the 35S promoter is located).

Double-stranded DNA break repair (DSBR) is recognized to be involved in the illegitimate recombination which enables plasmid DNA to integrate into plant genomes following plant transformation (22, 23); and

transgene rearrangements have been identified in both *Agrobacterium*-mediated transformation (24) and particle bombardment (25). Illegitimate recombination was also observed between a resident transgene in a transgenic tobacco plant and a newly delivered transgene (26). Illegitimate recombination involves sequences with either microhomology or no homology between the junctions, often resulting in filler DNA and deletions of nucleotides from one or both of the recombining ends (27).

Kohli *et al* (3) analysed 12 multicopy transgenic rice lines transformed with a co-integrate plasmid by means of particle bombardment in order to investigate the fate of exogenous transforming DNA. They not only discovered the same kind of illegitimate recombination between plasmids, but also that many of the illegitimate recombinations were located to the CaMV 35S promoter hotspot previously identified (19). Furthermore, recombination occurred at high frequency without the virally encoded reverse transcriptase or other enzymes, suggesting that plant factors can direct recombination events by recognising and using these highly recombinogenic viral sequences.

The hotspot located by Kohli *et al* (3) was an imperfect palindrome of 19 bp at the 3' end of the CaMV 35S promoter containing the TATA box. The palindrome and surrounding DNA sequences were found to have a number of characteristics common to known recombination hotspots. One half of the 19 bp palindrome was purine rich, and it is known that recombinase proteins bind to such regions. Topoisomerase I cleavage sites, the trinucleotide AAG, are also found clustered around the recombining junctions in the hotspot, which is either part of the junction or present within 3 bp of it in 8 out of the 11 junctions analysed by Kohli *et al* (3). A 32 bp region with 90% AT content was found in the 35S promoter 28 bp upstream from the palindrome. AT-rich regions cause isotropic DNA bending and influence DNA melting. They contain matrix attachment region (MAR) motifs, which harbour intrinsically curved DNA, and have been found in the vicinity of other recombination hotspots. The 19 bp palindrome itself contains a short tract of alternating purine-pyrimidine (AT) residues situated 50 bp upstream from another alternating purine-pyrimidine sequence in the transgene. Such residues are known to adopt Z DNA conformation and have been shown to influence transcription and recombination, and are also binding sites for topoisomerase II, which is specifically involved in the resolution of recombination intermediates.

The structure and sequence-specific properties of the 3' end of the CaMV 35S promoter are similar to the petunia transformation booster-sequence which increased plant transformation efficiency, most probably by stimulating recombination (28). Similar structures and sequence-specific characteristics were identified for recombinogenic regions of SV40 DNA in HeLa cells (29). The 25 bp border

repeats of the *Agrobacterium* T-DNA, the most commonly used vector for plant transformation, also show remarkable similarities to the recombination hotspot of the CaMV 35S promoter. There is an 11 bp imperfect palindromic sequence with a TATAbox-like structure in the right border whereas the left border has a short purine-rich sequence in the centre. Kohli *et al* (3) predicts that these two regions of T-DNA could be involved in rearrangements which are often seen in T-DNA mediated plant transformations.

It is clear that the CaMV 35S promoter is well-endowed with motifs involved in recombination. An additional factor which may increase the instability of the plasmid is the junction between CaMV 35S promoter and foreign DNA. All these considerations make it highly likely that the CaMV 35S promoter will take part in horizontal gene transfer and recombination, and also cause largescale genomic rearrangements in the process.

Horizontal transfer of the CaMV promoter not only contributes to the known instability of transgenic lines (30), but has the potential to reactivate dormant viruses or creating new viruses in all species to which it is transferred, particularly in view of the modularity and interchangeability of promoter elements (8). In this regard, the close relationship of CaMV to hepadnaviruses such as the human hepatitis B is especially relevant. In addition, because the CaMV promoter is promiscuous in function (see above), it has the possibility of promoting inappropriate over-expression of genes in all species to which it happens to be transferred. One consequence of such inappropriate over-expression of genes may be cancer.

Our considerations should be seen in the light of the results of the first systematic safety testing of transgenic food backed up by histological studies, which was carried out by Pusztai and his collaborators. Ewen and Pusztai (31) conclude that a significant part of the toxic effects of transgenic potatoes with snowdrop lectin was due to the "construct or the genetic transformation (or both)". They further state, "The possibility that a plant vector in common use in some GM plants can affect the mucosa of the gastrointestinal tract and exert powerful biological effects may also apply to GM plants containing similar constructs..." The plant vector in common use is the T-DNA of *Agrobacterium*, and the construct in question is the CaMV 35S promoter, both of which are in the transgenic potatoes tested by Ewen and Pusztai (31).

As a precautionary measure, we strongly recommend that all transgenic crops containing CaMV 35S or similar promoters which are recombinogenic should be immediately withdrawn from commercial production or open field trials. All products derived from such crops containing transgenic DNA should also be immediately withdrawn from sale and from use for human consumption or animal feed.

## REFERENCES

1. Ho MW, Traavik T, Olsvik R, Tappeser B, Howard V, von Weizsacker C, McGavin G. Gene Technology and Gene Ecology of Infectious Diseases. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1998; 10: 33–59.
2. Traavik, T. (1999). *Too Early May Be Too Late. Ecological Risks Associated with the Use of Naked DNA as a Biological Tool for Research, Production and Therapy* (Norwegian), Report for the Directorate for Nature Research Tungasletta 2, 7005 Trondheim.
3. Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DA, Christou P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *The Plant Journal* 1999; 17: 591–601.
4. Turner DS, McCallum DG, Covey SN. Roles of the 35S promoter and multiple overlapping domains in the pathogenicity of the pararetrovirus cauliflower mosaic virus. *J. Virol.* 1996; 70: 5414–21.
5. Cann, A.J. (1997). *Principles of Molecular Virology*, 2nd ed., Academic Press, London.
6. Xiong Y, Eickbush TH. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 1990; 9: 3353–62.
7. Benfy PN, Chua N-H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 1990; 250: 959–66.
8. Hohn T, Fütterer J. Transcriptional and translational control of gene expression in cauliflower mosaic virus. *Curr. Op. Genet. Develop.* 1992; 2: 90–6.
9. Noad RJ, Turner DS, Covey SN. Expression of functional elements inserted into the 35S promoter region of infectious cauliflower mosaic virus replicons. *Nucleic Acid Res* 1997; 25: 1123–9.
10. Fang R-X, Nagy F, Sivabramaniam S, Chua N-H. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* 1989; 1: 141–50.
11. Fütterer, J. (1992) unpublished result, cited in [7].
12. Comai I, Moran P, Maslyar D. Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements. *Plant Mol. Biol* 1990; 15: 373–81.
13. Last DI, Brettell DA, Chamberlain AM, Chaudhury AM, Larkin PJ, Marsh EL, Peacock WJ, Dennis ES. pEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theor. Appl. Genet* 1991; 81: 581–8.
14. Batraw MH, Hall TC. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-(glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol* 1990; 15: 527–38.
15. Bekkaoui F, Datla RSS, Pilon M. The effects of promoters on transient expression in conifer cell lines. *Theor. Appl. Genet* 1990; 79: 353–9.
16. Jarvia EE and Brown LM, (1991). Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella*
17. Hirt H, Kogl M, Murbacher T, Heberle-Bors E. Evolutionary conservation of transcriptional machinery between yeast and plants as shown by the efficient expression from CaMV 35S promoter and 35S terminator. *Curr. Genet* 1990; 17: 473–9.
18. Assad F, Signer ER. Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet* 1990; 223: 517–20.
19. Vaden VR, Melcher U. Recombination sites in cauliflower mosaic virus DNAs: implications for mechanisms of recombination. *Virology* 1990; 177: 717–26.

20. Gal S, Pisan B, Hohn T, Grimsley N, Hohn B. Genomic homologous recombination in planta. *EMBO J* 1991; 10: 1571–8.
21. Wintermantel WM, Schoelz JE. Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* 1996; 223: 156–64.
22. Gheysen G, Villarroel R, van Montagu M. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev.* 1991; 5: 287–97.
23. Salomon S, Puchta H. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-stranded break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* 1998; 17: 6086–95.
24. Derolles SC, Gardner RC. Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 1988; 11: 365–77.
25. Register JC, Peterson DJ, Bell PJ, et al. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* 1994; 25: 951–61.
26. De Groot MJ, Offringa R, Groet J, Does MJ, Van Hooykaas PJ, Danelzen PJ. Non-recombinant background in gene targeting. Illegitimate recombination between *hpt* gene and defective 5'-deleted *nptII* gene can restore a Km<sup>r</sup> phenotype in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 1994; 25: 721–33.
27. Gorbunov V, Levy AA. Non-homologous DNA and joining in plants cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucl. Acid Res.* 1997; 25: 4650–7.
28. Puchta H and Meyer P. (1994). Substrate specificity of plant recombinases determined in extrachromosomal recombination systems. *In Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants* (Paszowski, J., ed.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 123–155.
29. Stary A, Sarasin A. Molecular analysis of DNA junctions produced by illegitimate recombination in human cells. *Nucl. Acids Res.* 1992; 20: 4269–74.
30. Ho MW, Steinbrecher R. Fatal flaws in food safety assessment. *Environmental and Nutritional Interactions* 1998; 2: 51–84.
31. Ewen SWB, Pusztai A. Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *The Lancet* 1999; 354: 1353–4.

# Genome Scrambling - Myth or Reality?

## Transformation-Induced Mutations in Transgenic Crop Plants

Allison Wilson, PhD\*; Jonathan Latham, PhD  
and Ricarda Steinbrecher, PhD

### Summary of Report

Internationally, safety regulations of transgenic (genetically modified or GM) crop plants focus primarily on the potential hazards of specific transgenes and their products (e.g. allergenicity of the *B. thuringiensis cry3A* protein). This emphasis on the transgene and its product is a feature of the case-by-case approach to risk assessment. The case-by-case approach effectively assumes that plant transformation methods (the techniques used to introduce recombinant DNA into a plant) carry no inherent risk. Nevertheless, current crop plant transformation methods typically require tissue culture (i.e. regeneration of an intact plant from a single cell that has been treated with hormones and antibiotics and forced to undergo abnormal developmental changes) and either infection with a pathogenic organism (*A. tumefaciens*) or bombardment with tungsten particles. It would therefore not be surprising if plant transformation resulted in significant genetic consequences which were unrelated to the nature of the specific transgene. Indeed, both tissue culture and transgene insertion have been used as mutagenic agents (Jain 2001, Krysan *et al.* 1999).

In this report we examine the mutations introduced into transgenic crop plants by plant transformation. We have searched and analysed the relevant scientific literature for *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment, the two most frequently used plant transformation methods. We have also analysed the molecular data submitted to the USDA in applications requesting commercial approval for transgenic cultivars. Lastly, we have examined whether mutations arising from plant transformation have the potential to be hazardous and whether current safety tests are robust enough to detect hazardous mutations before they reach the market.

**Transformation-induced mutations:** In theory, plant transformation could result in exact insertion of a single transgene without further genomic disruption. In practice, this rarely, if ever, occurs. As we demonstrate in this report, in addition to the transgene, each transformed plant genome contains a unique spectrum of mutations resulting from (a) tissue culture procedures, (b) gene transfer methods such as *Agrobacterium*-mediated or particle bombardment transfer, (c) transgene insertion and

(d) superfluous DNA insertion<sup>1</sup>. These transformation-induced mutations can be separated into two types: those introduced at the site of transgene insertion, which we refer to as *insertion-site mutations* and those introduced at other random locations, which we refer to as *genome-wide mutations*.

**Insertion-site mutations:** Our search of the primary literature revealed that remarkably little is known about the mutations created in crop plants at the site of transgene insertion. This is true both for transgene insertion via *Agrobacterium*-mediated transformation (**Section 1.1**) and for particle bombardment (**Section 1.2**). This lack of understanding is caused in part by a lack of large-scale systematic studies of insertion-site mutations (**Sections 1.1.5** and **1.2.4**). Additionally, much of the available data comes from research on a non-crop plant, *Arabidopsis thaliana*, and it is not clear whether such results apply to crop plants.

**Agrobacterium-mediated transformation:** *Agrobacterium*-mediated transformation has been used to create commercial cultivars for over 10 years and is known to create insertion-site mutations (**Table 2, Section 1.1**). However, there has been only one large-scale study of the mutations created at insertion events<sup>2</sup> containing single T-DNA<sup>3</sup> inserts (the type of event preferred for commercial purposes; Forsbach *et al.* 2003). In this study of 112 single-copy T-DNA insertion events in *A. thaliana*, the researchers found that exact T-DNA integration almost never occurred (Forsbach *et al.* 2003). Most of the T-DNA insertions resulted in small (1-100 base pair) deletions of plant genomic sequences at the insertion-site. However, for a significant number (24/112) there was evidence for large-scale rearrangement of plant genomic DNA at the insertion-site. Two of these insertion events contained chromosomal translocations. The rest had rearrangements which were not fully characterised. It is known, however, that rearrangements of genomic DNA at T-DNA insertion sites can be very substantial. A 78Kbp deletion (removing 13 genes) is the largest recorded for T-DNA insertion (Kaya *et al.* 2000) and other researchers have reported duplication and translocation of a segment of DNA at least 40 Kbp in size (Tax and Vernon 2001). Superfluous DNA insertion is also a common feature of T-DNA insertion-sites (**Sections**

The full report is available in print from EcoNexus and can be downloaded for free from [www.econexus.info](http://www.econexus.info)

\*Please send correspondence to [A.Wilson@econexus.info](mailto:A.Wilson@econexus.info)

1 Superfluous DNA is defined as any transferred DNA other than a single copy of the desired transgene and includes: marker gene sequences, bacterial plasmid sequences, fragments of bacterial genomic DNA, and additional whole or partial copies of the transgene.

2 A transgene insertion event consists of the transgene and its flanking sequences.

3 The T-DNA is the segment of DNA bounded by the T-DNA borders which is transferred to a plant via *Agrobacterium*-mediated transformation. The T-DNA contains the desired transgene and often contains marker DNA. It is carried on the Ti plasmid and sometimes plasmid DNA outside the T-DNA borders is also transferred.

**1.1.1-1.1.3.** For example, Forsbach *et al.* (2003) found that 8 of their 112 single copy T-DNA insertion events also had large insertions of superfluous plasmid or T-DNA sequences. The majority of the remaining lines had insertions of 1-100 bp of DNA of undefined origin.

The results of these and other studies suggest that the vast majority of T-DNA insertion events include small or large genomic DNA disruptions and insertions of superfluous DNA.

**Particle bombardment transformation:** Particle bombardment has also been used to create numerous commercial cultivars (**Table 2**). Although it can result in large scale genomic disruption, there are few studies detailing the insertion-site mutations resulting from particle bombardment (**Section 1.2**). Furthermore, there have been no large-scale systematic studies of such mutations.

Most of the particle bombardment insertion events that are described in the scientific literature are extremely complex (Pawlowski and Somers 1996). Multiple copies of delivered DNA are often interspersed with small or large fragments of plant genomic DNA (Kohli *et al.* 2003). One paper even reported the insertion of bacterial chromosomal DNA at a particle bombardment insertion-site (Ulker *et al.* 2002).

Without the use of PCR and DNA sequencing, analyses of insertion-site mutations are likely to be incomplete. We have found only two particle bombardment studies where PCR and DNA sequence analyses were used to characterise mutations created at single-copy insertion events which had been isolated from intact plants. In one paper (Makarevitch *et al.* 2003), 3 insertion events were analysed, in the other (Windels *et al.* 2001), the commercialized Roundup Ready® soybean insertion event 40-3-2 was analysed. The mutations present at each of these four 'simple' insertion events appeared to include large-scale genomic deletions and/or rearrangements, in addition to stretches of scrambled genomic and transferred DNA (Makarevitch *et al.* 2003, Windels *et al.* 2001). For example, in addition to the intended EPSPS<sup>4</sup> transgene described in the original application, soybean event 40-3-2 included a 254 bp EPSPS gene fragment, a 540 bp segment of unidentified DNA, a segment of plant DNA and another 72 bp fragment of EPSPS, as well as additional unspecified genomic alterations (Windels *et al.* 2001, USDA petition 93-258-01p). These insertion event mutations were only reported after commercialisation of Roundup Ready® soybean insertion event 40-3-2. It is interesting that independent analysis of another commercialized cultivar suggested that Maize YieldGard® insertion event Mon810 also includes additional unspecified and previously unreported insertion-site mutations (Hernandez *et al.* 2003).

For particle bombardment insertion events, we could find no study in which the sequence of a transgene insertion-site was successfully compared to the original undisturbed site (**Section 1.2.4**). Thus the full extent of mutation at a transgene-containing particle bombardment insertion-site has never been reported, either in the scientific literature or in applications submitted to regulators<sup>5</sup>. The existing sequence data describing particle

bombardment insertion events are thus extremely limited. However, these data suggest that transgene integration at particle bombardment insertion events is always accompanied by substantial genomic disruption and superfluous DNA insertion.

**Southern blot analysis is insufficient to identify all insertion-site mutations:** Another limitation to the understanding of insertion-site mutations is that Southern blot hybridisation is the technique most commonly used to analyse transgene insertion events for both research and regulatory purposes (Kohli *et al.* 2003). Analysis of transgene insertion-sites by other techniques such as FISH, PCR or DNA sequencing indicates that Southern blot analysis is not sufficient to reliably determine either the presence of superfluous DNA or the extent of genomic disruption at the transgene insertion-site (**Sections 1.1.4 and 1.2.3**). For example, Mehlo *et al.* (2000) used both PCR and Southern Blot analysis to analyse particle bombardment insertion events and concluded that Southern blotting was useful only in detecting large-scale features of the transgene insertion-site. In another study, fiber-FISH techniques were used to analyse a particle bombardment insertion event which was predicted by Southern blotting to contain tandem repeats of a transgene (Svitashev and Somers 2001). Their analysis revealed that there were actually 3-10 Kbp of chromosomal DNA between most of the repeats. This suggests that, in some cases, Southern blot analysis is inadequate for identifying even large-scale rearrangements.

These and other reports lead us to draw various conclusions. Firstly, that analysis of transgenic lines based solely or primarily on Southern blot data can miss many of the mutations present at insertion-sites. Thus, the plant genome is probably more disrupted by transgene insertion than commonly supposed. Secondly, that, as almost all commercial approvals of transgenic events or cultivars are based primarily on Southern blot analysis of transgene insertion (**Table 2, Appendix**), it is likely that most transgenic events currently approved for commercial use harbour unreported large and small-scale transgene insertion-site mutations.

**Genome-wide mutations:** In this report we also examine what is known about mutations which are introduced as a result of tissue culture and gene transfer procedures but which are not associated with insertion of the transgene (**Section 2**). There are 5 studies in which researchers have attempted to quantify the number of mutations introduced during plant transformation (reviewed in Sala *et al.* 2000). These researchers used DNA polymorphism analysis (based on RFLP, AFLP and other PCR techniques) to compare the genomes of transformed plants to the genomes of non-transformed control plants. Their results suggest that many hundreds or thousands of such genome-wide mutations are likely to be present in plants transformed using typical plant transformation methods, especially those involving the use of plant tissue culture techniques (**Section 2.3**). In one study, Labra *et al.* (2001) estimated that the "genomic similarity value" of control plants was 100%, but only 96- 98% for the transgenic plants. In other words, very extensive genetic mutation had resulted from the plant transformation procedures. Even though the numbers of mutations found in these studies were high, the nature of the analytical techniques used in these experiments suggests that these

event included rearrangement of the genomic DNA flanking the fragment and an 845 bp deletion of genomic DNA.

4 The EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) gene from *Agrobacterium* sp. Strain CP4 confers tolerance to the herbicide glyphosate.

5 Makarevitch *et al.* (2003) were able to compare the insertion-site of a 296 bp transgene fragment to its target site. They found the insertion



figures may underestimate the extent of mutation to the plant genome (**Section 2.5**). Also, such studies do not address the nature of these mutations, such as whether they are small scale or large-scale genomic changes and whether they occur in functional regions of the genome.

Depending on the extent of outcrossing or backcrossing undergone by the primary transformant, many and sometimes all of the mutations created in the primary transformant are likely to be retained in commercialised cultivars (**Section 4.3**). Even where backcrossing has been extensive, genome-wide mutations genetically linked to the transgene insertion-site probably remain in the commercial cultivar.

Genome-wide mutations have been found in all transformed plants examined and such mutations have been shown to be heritable (Sala *et al.* 2000). However, current safety regulations do not require any testing or analysis of genome-wide mutations in commercial cultivars.

**Significance of transformation-induced mutations:** Insertion-site and genome-wide mutations can be hazardous if they occur in a functional region of plant DNA (**Section 3**). Mutations in functional plant DNA, including gene coding sequences or regulatory sequences, may have implications for agronomic performance or environmental interactions or for animal or human health. For example, a transformation-induced mutation might disrupt a gene whose product is involved in nutrient biosynthesis, resulting in altered nutrient levels, or it might disrupt or alter a gene involved in the regulation or synthesis of compounds toxic to humans. Disruption of a gene encoding a regulatory protein, such as a transcription factor, could result in the miss-expression of numerous other genes. Such biochemical changes would be unpredictable and difficult to identify even with extensive biochemical testing (Kuiper *et al.* 2001). Typically, only a few biochemical tests are required by regulators. Therefore, using current safety assessments, many of the harmful phenotypes which could arise from transformation-induced mutations would be unlikely to be identified prior to commercialisation.

**Frequency of disruption of functional DNA by transformation-induced mutations:** The limited amount of data available suggests that transgenes frequently insert into or near gene sequences<sup>6</sup> (**Section 1.1.6**). In the few plant species studied, DNA sequence analysis of T-DNA insertion-sites suggests that approximately 35-58% of transgene insertions disrupt plant gene sequences (Forsbach *et al.* 2003, Jeong *et al.* 2002, Szabados *et al.* 2002). Similar studies of transgenes delivered via particle bombardment have never been conducted (**Section 1.2.5**).

Despite its importance for safety assessment, it is usually not clear whether transgenes in commercial lines have inserted into or near gene sequences. Most applications submitted to the USDA requesting permission to commercialise a transgenic line provide neither the sequence of the genomic DNA flanking the inserted transgene nor a comparison with the original target-site sequence (**Table 2, Appendix**). An added difficulty in determining the significance of an insertion event is that it is

currently not possible to know with certainty that a region of the genome is non-functional<sup>7</sup>.

The frequency with which genome-wide mutations disrupt functional DNA has never been specifically investigated. However, the successful use of tissue culture to induce mutations for research and breeding purposes (**Section 2.1**) and the isolation, from populations of transformed plants, of mutant phenotypes which are not linked to a transgene insert (**Section 2.2**) both suggest that genome-wide mutations do frequently occur in functional DNA sequences.

Even if no functional sequences are disrupted, transgene and superfluous DNA insertions are not necessarily harmless or inert. Promoter sequences may alter the expression of neighbouring genes (Weigel *et al.* 2000), while bacterial chromosomal or plasmid sequences (bacterial origins of replication in particular) inserted adjacent to the transgene may enhance the probability of horizontal gene transfer (**Section 3.2**). Of the 8 commercial cultivars and events that we analysed for this report, 6 had insertions of superfluous bacterial and/or viral DNA at the insertion event (**Table 2, Appendix, Sections 1.1.7 and 1.2.6**).

**Appropriate safety assessment of transgenic crop plants:** In support of the case-by-case approach to regulation and risk assessment, it is often suggested that genetic engineering is as safe as other modern plant breeding technologies. We analyse the assumptions behind this assertion with respect to the plant transformation techniques used to genetically engineer a transgenic plant (**Section 4**). First we note that the hazards arising from other types of plant breeding technology are not well characterised (**Section 4.1**). Second we note that 'safety' has never been measured either absolutely or relatively for any method of plant breeding, making comparisons between breeding methods difficult, if not impossible (**Section 4.4**). Therefore, we suggest that to try and determine the risks arising from plant transformation by comparing it to other plant breeding methods is neither logical nor even possible. We argue instead that proper safety assessment of transgenic crop plants requires scientific analysis of the specific hazards and risks arising from genetic engineering (**Section 4.5**). As well as the specific risks arising from the transgene, these risks would include risks which arise from plant transformation methods.

**Conclusions:** This report identifies the insertion-site and genome-wide mutations created by plant transformation procedures as potentially major, but poorly understood, sources of hazard associated with the production and use of commercial transgenic cultivars.

We suggest that an understanding of the implications of transformation-induced mutations urgently needs to be incorporated into regulatory frameworks (**Section 5**). To facilitate this, we make various recommendations (**Section 6**), including a requirement for complete analysis of insertion-site and genome-wide mutations in transgenic cultivars prior to commercialisation. We suggest that

---

<sup>7</sup> Other factors increase the difficulty in determining whether insertion into a particular region of the genome or the presence of a particular insertion-site mutation is without consequence. In other higher eukaryotes, long-range regulatory interactions are common (Carter *et al.* 2002). In other words, regulatory sequences can be hundreds of Kbp away from the gene coding sequences or even act *in trans*. There is also evidence in many cases that genes are clustered in the genome and that gene order can be important for gene regulation (Hurst *et al.* 2004).

---

<sup>6</sup> It should be noted that because transgene-containing cells or plants are usually identified by selecting for the expression of a marker gene, current plant transformation methods are actively selecting for insertion events occurring in functional transcribed (and thus gene-rich) regions of the genome.

changes to both transgenic plant breeding practices and to the regulation of transgenic crop plants are required so that hazardous mutations are either prevented, or identified and removed, prior to commercialisation.

As discussed in this report, food crops are not inherently safe. All plants produce harmful substances and many food crops are derived from inedible ancestors and may contain toxic tissues or organs. They therefore have within them the genetic potential to cause harm. Consequently, the genetic stability of cultivars in the plant breeding pool is crucial if plant breeders are to produce reasonably safe cultivars. The presence of transformation-induced mutations poses a threat to this stability that is potentially very serious and that is also entirely unnecessary. In addition, the pool of cultivars available to farmers is declining and certain cultivars are grown on a large scale worldwide. Consequently, ensuring the safety of commercial transgenic cultivars presents a major challenge for governments and institutions involved in biosafety regulation.

**Abbreviations:** **AFLP:** amplified fragment length polymorphism, **bp:** base pairs, **FISH:** fluorescent *in situ* hybridisation, **Kbp:** Kilobase pairs, **PCR:** polymerase chain reaction (DNA amplification method), **RFLP:** restriction fragment length polymorphism, **T-DNA:** transferred- DNA, the DNA sequences contained between left and right border repeats of the Ti plasmid of *Agrobacterium* that is transferred to plant genome during *Agrobacterium*-mediated transformation, **Ti-Plasmid:** tumour inducing plasmid, **USDA:** United States Department of Agriculture.

## References

- Carter D, Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Fraser P (2002). Long-range chromatin regulatory interactions *in vivo*. *Nature Genetics* 34(4): 623-626.
- Forsbach A, Shubert D, Lechtenberg B, Gils M, Schmidt R (2003) A comprehensive characterisation of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Mol Biol* 52: 161-176.
- Hernandez M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomenech P, Ferrando A (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard® based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Research* 12: 179-189.
- Hurst LD, Pal C, Lercher MJ (2004) The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nature Reviews Genetics* 5(4): 299-310.
- Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
- Jeong, D-H, An S, Kang H-G, Moon S, Han J-J, Park S, Lee HS, An K, An G (2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol* 130: 1636-1644.
- Kaya H, Sato S, Tabata S, Kobayashi Y, Iwabuchi M, Araki T (2000) *hosoba toge toge*, a syndrome caused by a large chromosomal deletion associated with a T-DNA insertion in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 41(9): 1055-1066.
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 52: 247-258.
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11:2283-2290.
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HPJM, Kok EJ (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J* 27(6): 503-528.
- Labra M, Savini C, Bracale M, Pelucchi N, Colombo L, Bardini M, Sala F (2001) Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 20: 325-330.
- Makarevitch I, Svitashv SK, Somers DA (2003) Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Mol Biol* 52: 421-432.
- Mehlo L, Mazithulela, Twyman RM, Boulton MI, Davies JW, Christou P (2000) Structural analysis of transgene rearrangements and effects on expression in transgenic maize plants generated by particle bombardment. *Maydica* 45: 277-287.
- Pawlowski WP and Somers DA (1996) Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Mol. Biotech* 6: 17-30.
- Sala F, Arencibia A, Castiglione S, Yifan H, Labra M, Savini C, Bracale M, Pelucchi (2000) Somaclonal variation in transgenic plants. *Acta Hort* 530: 411-419.
- Svitashv SK and Somers DA (2001) Genomic interspersions determine the size and complexity of transgene loci in transgenic plants produced by microprojectile bombardment. *Genome* 44: 691-697.
- Szabados L, Kovacs I, Oberschall A, Abraham E, Kerekes I, Zsigmond L, Nagy R, Alvarado M, Krasovskaja I, Gal M, Berente A, Redei GP, Haim AB, Koncz C (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J* 32: 233-242.
- Tax FE, Vernon DM (2001) T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiol* 126: 1527-1538.
- Ulker B, Weissinger AK, Spiker S (2002) *E. coli* chromosomal DNA in a transgenic locus created by microprojectile bombardment in tobacco. *Transgenic Res.* 11: 311-313.
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang Z-Y, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 1003-1013.
- Windels P, Taverniers I, Depicker A, Van Bockstaele E, De Loose M (2001) Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *Eur Food Res Technol* 213: 107-112.

**EcoNexus** is a not-for-profit public interest research organisation and science watchdog. It offers a rigorous scientific critique of genetic engineering and genetically modified organisms. It investigates and reports on the impacts of genetic engineering on the environment, health, food security, agriculture, human rights and society. It is based in the UK and collaborates with a diversity of networks nationally and internationally.

**Allison Wilson**, PhD, is a plant molecular geneticist.  
**Jonathan Latham**, PhD, is a molecular biologist and virologist.

**Ricarda Steinbrecher**, PhD, is a developmental biologist and geneticist.

## ECONEXUS

P.O. Box 3279,

Brighton BN1 1TL, UK

(+44) 0845-456-9328

info@econexus.info www.exonexus.info

Technical Paper - February 2004 (January 2003)

## GM Gene Flow (B)

# **Horizontal gene transfer of viral inserts from GM plants to viruses**

by

**Jonathan Latham, PhD**

**Ricarda Steinbrecher, PhD**

**ECONEXUS**

P.O.Box 3279  
Brighton BN1 1TL, UK  
(+44) 01273 625 173  
info@econexus.info  
www.econexus.info

Amended review paper for the GM Science Review Meeting  
of the Royal Society of Edinburgh on  
“GM Gene Flow: Scale and Consequences for Agriculture and  
the Environment”

# GM Gene Flow (B):

## Horizontal gene transfer of viral inserts from GM plants to viruses

Jonathan R Latham, PhD and Ricarda A Steinbrecher, PhD

Econexus; PO Box 3279; Brighton BN1 1TL; UK; info@econexus.info

GM Science Review Meeting of the Royal Society of Edinburgh on  
“GM Gene Flow: Scale and Consequences for Agriculture and the Environment”

27 January 2003 - amended February 2004

### Contents

INTRODUCTION.....	1
BACKGROUND.....	2
THE COMMERCIAL BACKGROUND.....	2
NATURAL VIRUS RECOMBINATION .....	2
EVIDENCE FOR RECOMBINATION WITH TRANSGENES .....	2
PREDICTING VIRUS HAZARDS FROM HGT .....	3
COMMERCIALISATION AND BIOSAFETY ASSUMPTIONS .....	4
REDUCING THE RISK OF HGT FROM TRANSGENE TO VIRUS.....	5
CONCLUSIONS.....	6
REFERENCES.....	7

### Introduction

The use of GM plants containing viral inserts (as transgenes or promoters) raises the possibility that these inserts may lead to the creation of new viruses through recombination (HGT). Viruses commonly evolve by recombination and have been shown to recombine with transgenes which are derived from viruses in numerous laboratory-scale experiments (e.g. Greene and Allison 1994, 1996). These recombination events can generate viruses with new biological properties (e.g. Wintermantel and Schoelz 1996). The creation of new viruses by recombination with a transgene is therefore a plausible risk whose possibility has been a focus of concern in the scientific literature (de Zoeten 1991; Hull 1994; Gibbs 1994; UCS 1994; Allison et al 1997; Gibbs et al 1997). The creation of new viruses would have consequences not just for agricultural systems but also in the wider context of human health and environmental protection, as many viruses are only controlled by time-consuming precautions and extensive pesticide use (Rybicki and Pietersen 1999; Morales and Anderson 2001).

The risks of HGT posed by virus-derived gene constructs in transgenic crops have been reviewed before (de Zoeten 1991; Tepfer 1993; Falk and Bruening 1994;

APHIS 1995; Allison *et al* 1996; Robinson 1996; Miller *et al* 1997; Aaziz and Tepfer 1999; DETR 1999; Hammond *et al* 1999; Ho *et al* 1999; Rubio *et al* 1999; Power 2002; Tepfer 2002).

We demonstrate here that the views of many scientists working in this area (as reflected in the scientific literature) are at odds with the policy of widespread commercialisation of virus-containing GM crops being pursued by the USDA. Neither do they support the conclusions of the recent DETR policy advisory report on the use of viral inserts in GM crops (UK DETR 1999).

The published scientific data best supports the conclusion that GM crops containing virus-derived transgenes should not at present receive commercial approval. This is because recombination (HGT) leading to the creation of new viruses is inevitable, while the consequences of such recombination cannot at present be predicted. Little or no effort has been made to minimise the risks posed by the use of viral transgenes in commercialized crops and their use is often entirely unnecessary (e.g. the use of the CaMV 35S promoter). Consequently, the use of viral sequences poses both substantial and unnecessary

risks. Commercialisation of crops containing virus-derived transgenes is therefore irresponsible at present.

**Abbreviations:** CaMV, Cauliflower mosaic virus; CMV, cucumber mosaic virus; FMV, Figwort mosaic virus; HGT, horizontal gene transfer; PTGS, post-transcriptional gene silencing; PLRV, Potato leaf roll virus; PRSV, Papaya ringspot virus; WMV-2 Watermelon mosaic virus; ZYMV Zucchini yellow mosaic virus

## Background

Commercial transgenic crops contain viral sequences for two main reasons, to regulate gene expression or to confer virus resistance. CaMV terminator sequences, the CaMV 35S promoter and promoters from other caulimoviruses are all used to engineer high constitutive levels of gene expression. Most commercialised GM varieties contain one or more virus promoters.

Viral sequences are also being used to engineer resistance to viruses. Virus-resistance in transgenic plants is called pathogen derived resistance (PDR). PDR is the expression of viral mRNAs or proteins which confer resistance to related (and sometimes unrelated) viruses. While much remains to be discovered, a consensus is emerging that most PDR observed in transgenic plants is obtained through a post-transcriptional, homology-based, gene silencing mechanism, in which both the transgene mRNA and the infecting virus are degraded (e.g. Ahlquist 2002). Thus, in principle, any virus sequence engineered into a transgenic plant may confer resistance to a virus carrying a homologous sequence. Transgenic plants containing virus coding sequences are much less common than transgenic plants containing viral promoter sequences but, as presently used, are considered to carry greater risks for viral recombination. To-date only varieties of squash, potato and papaya have been commercially approved to carry virus-resistance genes in the US (Table 1). Unlike natural virus infections, viral inserts are present in every cell of the transgenic plant containing them.

This review focuses on these two applications of viral inserts since their HGT risks illustrate or generalise. It concentrates primarily on virus-resistance transgenes.

## The commercial background

In 1995 Upjohn released the first commercial transgenic virus-resistant plant: ZW-20 squash and later an upgrade: the CZW-3. This latter variety contains genes coding for coat proteins of the cucumovirus CMV and the potyvirus ZYMV and WMV-2. Also authorised for commercial use in the US are potatoes expressing potato leaf roll virus (PLRV, a polerovirus) replicase and potatoes

expressing the potato virus Y (PVY, a potyvirus) coat protein. Papaya expressing PRSV (a potyvirus) and cucumber mosaic virus (CMV, a cucumovirus) fusion coat protein has also been approved and has been used in Hawaii.

Although most authorised field tests in the US have been of coat protein genes, some utilise viral replicase genes, viral movement protein genes, viral proteases, viral helper component (HC proteins) and others which are less well characterised. It is probable that most or all of these are being used to engineer virus resistance (Tepfer 2002). Field tests of similar crops have been conducted in the UK.

## Natural virus recombination

The risks of transgene/virus recombination can only be understood in the context of the background level of recombination events between related and unrelated viruses in natural and agricultural settings. In nature, the majority of new viruses arising by recombination are non-viable, have low fitness or are indistinguishable from their progenitors. It is nevertheless well-established that new and successful variants of viruses do arise naturally by recombination with a frequency that varies depending on the virus family (e.g. Chenault and Melcher 1994; Revers *et al* 1996; Padidam *et al* 1999). Natural recombination is more common between closely related strains or species of RNA and DNA viruses. Like DNA recombination, RNA recombination is likely to be promoted by shared replication origins and DNA or RNA sequence homology (similarity) (Nagy and Simon 1997). Despite this bias towards homologous recombination most viruses contain in their phylogenetic history a record of multiple recombination events between more distantly related viruses (reviewed in: Koonin and Dolja 1993; Chenault and Melcher 1994; Simon and Bujarski 1994; Roosinck 1997). Some of them are also known to have recombined with non-homologous host genes (Mayo and Jolly 1991). This general pattern of recombination is also found in animal viruses (Lai 1992). Thus viral recombination occurs naturally and gives rise to viruses of great agricultural and economic importance. Any new technology that might enhance the rate of emergence of new viruses is a source of concern.

## Evidence for recombination with transgenes

Many plant viruses have now been shown to be able to routinely recombine with transgenes. In laboratory studies recombination of a transgene with an infecting RNA virus has been demonstrated for a dianthovirus (Xiong and Lommel 1991), a bromovirus (Greene and Allison 1994; Greene and Allison 1996), a tombusvirus (Borja *et al*

1999), a tobamovirus (Adair and Kearney 2000) and a potyvirus (Varrelmann *et al* 2000). For the pararetrovirus CaMV, recombination of both its' RNAform (Schoelz and Wintermantel, 1993; Wintermantel and Schoelz 1996) and its' DNA form (Gal *et al* 1992) have been reported, as has recombination between a geminivirus (a DNA virus) and chromosomal DNA (Frischmuth and Stanley 1998). In some cases recombination occurred at very high rates-in up to 80% of all plants tested (Borja *et al* 1999).

Since repair of a defective virus was used in these experiments (to permit detection of recombinant progeny), in all cases (except one, Xiong and Lommel 1991) recombination was between a transgene and a virus with homologous (or nearly so) sequences. Whether recombination events with less homologous viral sequences will occur at comparable rates is a still-unresolved question. Other things being equal, recombination with more dissimilar viruses may occur but probably will be less common since homology (similarity) promotes recombination (Nagy and Simon 1997).

Although these experiments were restricted to greenhouses, they suggest no clear reason why field-grown virus-expressing transgenic plants should not also show recombination (but see below).

## Predicting virus hazards from HGT

The principle danger (from an HGT perspective) inherent in the use of virus-derived transgenes in GM plants is that incoming viruses will acquire a transgene sequence to create a new virus strain or species. In a worst-case scenario this virus could cause either ecosystem or crop damage, necessitate intensive pesticide use (to control viral vectors) or require expensive and inconvenient containment procedures (Morales and Anderson 2001; Rybicki and Pietersen 1999). Both of these measures are currently used to control viruses.

Predicting which (if any) recombinant viruses will prove to be significantly pathogenic as a result of HGT is not presently feasible. This is because scientific understanding of virulence determinants and ecological fitness in viruses is almost non-existent. It is even not clear if recombination between closely related viruses should be of more or less concern than recombination between those that are distantly related. Among Caulimoviruses (the plant virus group most systematically tested) strains differ in symptomatology and titre in infected plants. Recombinants formed between two mild strains can nevertheless yield virulent progeny with high titre and severe symptoms (Anderson *et al* 1992). Thus viruses are complex systems, as are the plants they infect, and therefore one should not

necessarily expect simple additive results from recombination events.

Are there limits to how related viruses must be in order to recombine with a transgene to create a viable new virus? The phylogenetic evidence for a recombinational origin of most virus families reflects the fact that many virus proteins are frequently not virus-specific. For example, the viral movement protein of one virus may be used by another virus in a shared host plant (e.g. Cooper *et al* 1995). We have found over 100 papers in the scientific literature demonstrating these complementation (or synergistic) effects of a virus (or part of one) on infection by a second virus from a different species<sup>1</sup>. Complementation covers almost the complete diversity of viral traits and viral proteins. This includes replication (e.g. Goldberg and Brakke 1987; Anjos *et al* 1992; Hormuzdi and Bisaro 1995; Cooper *et al* 1995), host specificity and movement (e.g. Carr and Kim 1983; Barker 1989; Malyshenko *et al* 1989; Giesman-Cookmeyer *et al* 1995; Solovyev *et al* 1996; Agranovsky *et al* 1998; Lauber *et al* 1998; Briddon and Markham 2001); vector specificity (e.g. Kassanis and Govier 1971; Briddon *et al*, 1990; Baulcombe *et al* 1993; Ryabov *et al* 2001) and disablement of host defences (e.g. Pruss *et al* 1997; Sunter *et al* 2001; Liu *et al* 2002). These reports cover complementation crossing all known viral phylogenetic boundaries, though not for all traits. Researchers have shown that even an animal virus can infect a transgenic plant that expresses plant virus movement proteins (Dasgupta *et al* 2001). The conclusion to be drawn from this is that whenever a virus can use proteins from a distinct or unrelated virus, it could also use them if it acquires them in a recombination event.

Thus the greatest phylogenetic distance across which potentially viable recombinant events may plausibly occur is unclear but may be very great. So far, there have been no reports of recombinants between DNA and RNA viruses or between geminiviruses (DNA) and pararetroviruses (DNA) such as CaMV. Thus, though there are considerable possibilities for virus recombination, there may also be limitations.

---

<sup>1</sup> This information derives from three types of experiment: a) synergisms between two wild-type viruses in which one or both viruses benefit from the presence of the other; b) from experiments in which virus proteins are exchanged leading to a complete or partial restoration of the wild-type phenotype, and; c) from complementation type experiments where a transgenic plant expresses a viral protein from one virus species which complements a lost function in a defective virus from a different species. In all, more than 100 peer-reviewed articles, many of which detail more than one instance, found synergism or complementation which crossed at least a species boundary. Articles showing complementation only between strains within a species were excluded from this list.

## Commercialisation and biosafety assumptions

These experiments suggest that recombination between transgenes (as currently used) and viruses is inevitable. Consequently, justification for the commercial approval of GM crops incorporating virus sequences has taken the form of asserting that the recombinants which arise will have no significant ecological impact. i.e. that these recombination rates do not matter or should not be extrapolated to field situations. We discuss the evidence for these arguments in points -a) to -e).

**a) It is argued that the likelihood of HGT from viral transgenes is no greater than that from mixed infections** (Falk and Bruening 1994; USDA 1994; Hammond *et al* 1999). This argument is flawed because it ignores the fact that a transgenic plant is not equivalent to a plant infected with a virus and because most plants are not usually infected with any viruses. The relevant differences include:

1) For all commercialised virus-resistant plants the viral-derived transgene mRNA is expressed in every plant cell. Viruses, in contrast, often exhibit tissue tropisms which may not (or only partially) overlap with those of other viruses-e.g. they may be restricted to phloem cells (Barker and Harrison 1986; Latham *et al* 1997) while other virus infections may be restricted to surface tissues<sup>2</sup>. Thus transgenic crops will result in quantitatively and qualitatively enhanced opportunities for virus recombination (de Zoeten 1991; Gibbs 1994; Allison *et al* 1996).

2) In naturally occurring mixed infections, opportunities for recombination may be limited by intracellular compartmentalisation of viruses and antagonistic interactions between viruses. Animal viruses are known to often exclude each other from preinfected cells in a phenomenon known as superinfection exclusion (e.g. Simon *et al* 1990). Whether exclusion occurs widely between plant viruses is not known but the reported instances suggest it may be common. (e.g. Davis and Mizuki 1987; Sackey and Francki 1990; Allison *et al* 1997; Fraile *et al* 1997). This contrasts with viral transgenes which are present in every cell of each transgenic plant.

Thus, the possibilities for recombination between different viruses in a natural mixed infection are not clear. Thus it may be wrong to assume that natural mixed infections will invariably give rise to opportunities for recombination.

**b) Where observed levels of transgene mRNA are lower than those of genomic virus mRNA it is asserted that recombination frequencies will in turn be lower**

<sup>2</sup> Unsuccessful infections by non host-adapted viruses are called subliminal infections. Their prevalence is not known.

(e.g. Falk and Bruening 1994; USDA 1994; Rubio *et al* 1999). This argument is not well supported by data. In practice, recombination frequency is likely to be a function of the distribution of viral genomes within the cell as well as of their quantity (Gibbs 1994; UCS 1994). Not only are most viral genomes usually encapsidated, but most viruses also replicate in discrete foci, many of which are enclosed by membranes (e.g. Schwarz *et al* 2002). These factors may act to limit opportunities for recombination between viruses. Additionally, most instances of virus resistance rely on simultaneous repression of the transgene and virus replication by a post-transcriptional gene silencing mechanism (e.g. Gonsalves 1998). It has recently been shown that many viruses disable this system when infecting a host (Kasschau and Carrington 1998). Thus levels of transgene mRNA and protein may be much higher in virus-infected cells than in uninfected ones (Tepfer 2002). Consequently, we do not have a clear picture of whether recombination is more likely between viruses or between viruses and transgene mRNAs.

**c) It is proposed that recombinant viruses 'are unlikely' to survive competition from pre-existing viruses or will not give rise to significant new strains** (Falk and Bruening 1994; AIBS 1995; Aaziz and Tepfer 1999; Rubio *et al* 1999; Hammond *et al* 1999). These assertions are unsupported by either data, references or detailed arguments (Falk and Bruening 1994; Hammond *et al* 1999; Rubio *et al* 1999) nor are the situations they envisage precisely defined. Consequently, it is difficult to discern the basis of these claims and thus to evaluate them. They seem largely based on the adaptationist (and controversial) idea that newly arising organisms are necessarily less fit than preexisting ones (Pigliucci and Kaplan 2000). Space does not permit a detailed critique of this position except to say that 1) new and significant viruses do arise naturally by recombination (e.g. Briddon *et al* 1996; Zhou *et al* 1997; Moonan *et al* 2000) (as well as mutation) and 2) recombinant viruses created *in vitro* have been created which have superior fitness (in one or more respects) than their parents (Anderson *et al* 1992; Ding *et al* 1994; Fernandez Cuartero 1994). This argument also sidesteps the issue of whether a new and recombinant virus would find a new niche rather than compete with its progenitor. The damage caused by the many viruses which spread beyond their centre of origin, or to new crops, is testament to the ability of viruses to find new niches.

**d) The presumed mechanism by which commercially approved virus-resistant plants are thought to work is that post transcriptional gene silencing targets the transgene mRNA and a virus carrying homologous sequences. It is suggested that PTGS will prevent or reduce HGT because a selective pressure will be directed against any virus which acquires the transgene** (USDA 1994; AIBS 1995; Allison

*et al* 1996; Robinson 1996; DETR 1999; Rubio *et al* 1999; Hammond *et al* 1999; Varrelmann *et al* 2000; Power 2002).

This position was relied on by the USDA (USDA 1994) in deregulating the first virus-resistant plant variety (the ZW-20 squash). This argument has been undermined by the subsequent finding that infecting viruses can disable the post transcriptional gene silencing mechanism (PTGS) presumed to be the basis for all the commercially approved virus resistance transgenic traits (e.g. Voinnet *et al* 1999).

PTGS cannot therefore be relied upon to select against viruses which acquire the transgene in a recombination event.

e) **A final argument used is that reduction of virus prevalence due to growing resistant plants will reduce the rate of recombination and HGT** (Falk and Bruening 1994; Rubio *et al* 1999). It is difficult to assess the validity of this proposition and indeed the authors provide no supporting data. It is worth noting that virus-resistant transgenic crops are directed at excluding one or a few strains or species of virus (unless gene stacking is used). Much of the concern over HGT from transgenes to viruses focuses on viruses that do not routinely infect the transgenic host (Gibbs 1994). This is because this type of invading virus (which is *not* adapted to that host) would be acquiring a transgene that *is* adapted to that host and therefore useful to it. Even if acquisition of the new gene did not confer pathogenicity directly it could constitute a significant adaptive step in that direction, thus enabling a new virus to evolve. Virus adaptation to new hosts can be acquired by as little as a single base change (Ingham and Lazarowitz 1993;

Weiland and Edwards 1996), thus the barriers to mounting an infection can be small for some viruses.

Questioning of these assumptions would be pedantic if they did not form the bedrock of successful biosafety arguments in commercial applications to the USDA or were not used by the USDA itself (USDA 1994). With the exception of point e) every application for new virus-resistant varieties explicitly makes the above dubious and unsubstantiated arguments and selectively uses the scientific literature for support.

## Reducing the risk of HGT from transgene to virus

Various transgene modifications and safeguards might reduce the rate of HGT when making GM plants. These safeguards include avoidance of certain proteins known to interact with other viruses (AIBS 1995; Hammond *et al*; Power 2002); mutation or disablement of protein coding sequences (DETR 1999; Hammond *et al* 1999; Power 2002); removal of replication-associated sequences (Allison *et al* 1996; Miller *et al* 1997; DETR 1999; Hammond *et al* 1999); use of mild and endemic strains (Hammond *et al* 1999; Power 2002); and use of short viral sequences (Allison *et al* 1996). Almost no research has been devoted to investigating the feasibility or effectiveness of these possibilities and currently authorised commercial crops with viral inserts incorporate few of these precautions (see Table 1).

Variety name	Species	Constructs inserted	Notes
ZW-20	squash	3xCaMV 35s promoter 3x CaMV 35s terminator WMV-2 coat protein ZYMV coat protein	full length coat proteins, both detected in plants
CZW-30	squash	4x CaMV 35s promoter 4x CaMV 35s terminator CMV coat protein WMV-2 coat protein ZYMV coat protein	full length coat proteins, all 3 detected in plants
sunUp and 63-1	papaya	PRSV coat protein fused to short CMV coat protein sequence	full length protein product detected in plants
3 transgenic lines	potato	PVY coat protein FMV promoter	full length coat protein plus PVY 3' replication origin, mRNA only detected
7 transgenic lines	potato	PLRV replicase (ORFs 1 and 2) 2x FMV promoter	full length replicase (3.8Kb) mRNA only detected

**Table 1.** Varieties of GM virus-resistant crop approved for commercial use in the USA



## Conclusions

It is our conclusion that too little is known at present about the evolution, ecology, biochemistry and pathogenicity of viruses to allay the concerns about horizontal gene transfer (HGT) from plants containing viral transgenes. Risk assessment of transgenic crops for HGT involves extrapolation to large scales and diverse real-world situations, which cannot at present be done without the use of crucial and unsubstantiated assumptions. For example, it is a fundamental tenet of risk assessment that extrapolation from limited knowledge requires a robust mechanistic understanding of a new technology. Failure to establish this basic information can lead to incorporation of false assumptions into risk-assessment procedures. In the case of virus-resistant transgenic crops this information should certainly include substantial knowledge of the mechanism of virus-resistance, its characteristics and limitations. For instance, it now seems likely that the resistance mechanism for virus-resistant lines is *via* post transcriptional gene silencing (PTGS) and it is now known that PTGS is turned off by many viruses (e.g. Voinnet *et al* 1999). Thus a key assumption relied on by the USDA to argue against the likelihood of HGT now appears to be invalid (USDA 1994). As we showed in this paper, this was not the only unvalidated assumption used to justify approval. Not only is it unscientific to rely on unvalidated assumptions it is also indefensible to at the same time argue (before the general public), that only well-understood transgenes and systems are used in the manufacture of transgenic crop varieties.

We are not alone in concluding that more information on plant virus biology is needed and many authors have argued the necessity for more information (de Zoeten 1991; Tepfer 1993; AIBS 1995; Miller *et al* 1997; Aaziz and Tepfer 1999; Power 2002; Tepfer 2002). None of these authors has however made explicit the link between inadequate baseline information and irresponsible regulation. Unlike the USDA and other national regulatory bodies, we believe that lack of such knowledge requires delaying applications and withdrawing approval for the release of GM virus sequence-containing plant varieties on the grounds that approval is incompatible with a prudent and precautionary approach.

Furthermore, most of the HGT risks carried by commercial transgenic varieties containing virus inserts are probably unnecessary ones. To reduce HGT, non-viral promoters could be used, transgene sizes reduced, replication origins removed, protein expression prevented and gene sequences disabled. These improvements would probably not impact on transgene effectiveness. By not requiring applicants to incorporate these safety features, or to justify why they have not done so, regulators are exposing third parties to unnecessary risks.

The question of monitoring the consequences of virus sequences in GM crops is crucial. The power of

science derives from testing and refining its predictions. If we do not test predictions of a lack of impact of viral sequences in GM crops we will either learn nothing about the risks and hazards or we will learn it too late.

What is required above all is for the scientific community to make itself heard so that poor biosafety assessments are challenged in print and best practice is incorporated into commercial varieties. By not doing this the scientific community is perceived as failing to be independent of commercial pressures. It is difficult to see however, individual members of the scientific community, who wished to express such views, being able to do so explicitly and openly in the present climate.

## References

- Aaziz R, Tepfer M (1999) Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J Gen Virol* 80: 1339-1346 Part 6 JUN 1999
- Adair TL; Kearney CM (2000) Recombination between a 3-kilobase tobacco mosaic virus transgene and a homologous viral construct in the restoration of viral and nonviral genes. *Arch Virol.* 145: 1867-1883
- Agranovsky AA *et al* (1998) Beet yellows closterovirus HSP-70-like protein mediates the cell to cell movement of a potyvirus transport-deficient mutant and a hordeivirus-based chimeric virus *J. Gen. Virol.* 79: 889-895
- Ahlfquist P (2002) RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and gene silencing. *Science* 296: 1270-3
- Allison RF, Schneider WL, Greene AE (1996) Recombination in plants expressing viral transgenes. *Semin Virol* 7: 417-422
- Anderson *et al* (1992) Characterisation of a cauliflower mosaic virus isolate that is more severe and accumulates to higher concentrations than either of the strains from which it was derived. *MPMI* 5: 48-54
- Anjos R *et al* (1992) Soybean mosaic potyvirus enhances the titre of two comoviruses in dually infected soybean plants. *Phytopathol.* 82: 1022-1027
- APHIS (1995) Proceedings of a workshop: Transgenic virus-resistant plants and new plant viruses
- Banner L and Lai MM (1991) Random Nature of coronavirus RNA recombination in the absence of selection pressure. *Virology* 185: 441-445
- Barker H (1989) Specificity of effect of sap-transmissible viruses in increasing the accumulation of luteoviruses in co-infected cells. *Ann. Appl. Biol.* 115: 71-78
- Baulcombe DC *et al* (1993) Signal for potyvirus-dependent aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and the effect of its transfer to potato virus X *J. Gen. Virol.* 74 1245-1253
- Borja M, Rubio T, Scholthof HB, *et al.* (1999) Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *MPMI* 12: 153-162 1999
- Briddon R and Markham P (2001) Complementation of bipartite begomovirus movement functions by topocoviruses and curtoviruses. *Arch. Virol.* 146: 1811-1819
- Briddon R *et al* (1990) geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177: 85-94
- Briddon R *et al* (1996) Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, Tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219: 387-394
- Cooper B *et al* (1995) A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analogue increases susceptibility. *Virology* 206: 307-313
- Carr RJ and Kim K (1983) Evidence that bean golden mosaic virus invades non phloem tissue in double infections with tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 64: 2489-2492
- Chenault KD and Melcher U (1994) Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of cauliflower mosaic virus. *J. Mol. Evol.* 39: 496-505
- Dasgupta R *et al* (2001) Systemic spread of an RNA insect virus in plants expressing plant viral movement genes. *PNAS* 98: 4910-4915
- Davis RF and Mizuki MK (1987) Detection of cucurbit viruses. *New Jersey Plant Dis.* 71: 40-44
- DETR (1999) Research Report No. 11: Safety of plant viral inserts
- Ding S *et al* (1996) An interspecific hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *PNAS* 93: 7470-7474
- Falk BW, and Bruening G (1994) Will transgenic crops generate new viruses and new diseases. *Science* 263: 1395-1396
- Farinelli L *et al.* 1992. Heterologous encapsidation of potato virus Y strain O (PVY<sup>O</sup>) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVYN) in *Solanum tuberosum* cv. bintje. *Bio/Technology* 10: 1020-25
- Fernandez-cuartero B *et al.* (1994) Increase in the relative fitness of a plant virus RNA associated with its recombinant nature. *Virology* 203: 373-377
- Fraile A *et al* (1997) A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J. Virol.* 71: 8316-8320
- Frischmuth T and Stanley J (1998) Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African Cassava mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* 79 1265-1271
- Giesman-Cookmeyer D *et al* (1995) Tobamovirus and dianthovirus movement proteins are functionally homologous. *Virology* 213: 38-45
- Gal S *et al* (1992) Agroinfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. *Virology* 187: 525-533
- Gibbs M (1994) Risks in using transgenic plants? *Science* 264: 1650-1651
- Goldberg K and Brakke M (1987) Concentration of maize chlorotic mottle virus increased in mixed infections with maize dwarf mosaic virus, strain B. *Phytopathol.* 77: 162-167
- Gonsalves D (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36: 415-37
- Greene AE, Allison RF (1996) Deletions in the 3' untranslated region of cowpea chlorotic mottle virus transgene reduce recovery of recombinant viruses in transgenic plants. *Virology* 225: 231-234
- Greene AE, and Allison RF (1994) Recombination between a viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263: 1423-1425
- Hammond J; Lecoq H; Raccach B (1999) Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Adv. Virus Res.* 54: 189-314
- Ho M-W *et al.* (1999). Cauliflower mosaic viral promoter-a recipe for disaster? *Microb. Ecol. Health Dis.* 11:194-97
- Hormuzdi S and Bisaro D (1995) Genetic analysis of beet curly top virus: examination of the L2 and L3 genes in viral pathogenesis. *Virology* 206: 1044-1056
- Ingham D and Lazarowitz S (1993) A single missense mutation in the BR1 movement protein alters the host range of the squash leaf curl geminivirus. *Virology* 196: 694-702
- Kassanis B and Govier D (1971) The role of the helper virus in aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato virus C. *J. Gen. Virol.* 13: 221-228
- Kasschau K and Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of post transcriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-470
- Koonin EV and Dolja VV (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA virus: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 375-430
- Laubert E *et al* (1998) Cell to cell movement of beet necrotic yellow vein virus: 1. heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *MPMI* 7: 618-625
- Latham JR *et al* (1997) Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant J.* 11: 1273-1283
- Liu H *et al* (2002) Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated viruses. *Virology* 298: 232-239
- Lommel S and Xiong Z (1991) Reconstitution of a functional red clover necrotic mottle virus by recombinational rescue of the cell-to-cell movement protein. *J. Cell. Biochem.* 15A:151 (Abs.)
- Malyshenko SI *et al* (1989) Plant virus transport function: complementation by helper viruses is non-specific. *J. Gen. Virol.* 70: 2751-2757
- Miller WA; Koev G; Mohan BR (1997) Are there risks associated with transgenic resistance to luteoviruses? *Plant Dis.* 81: 700-710

- Moonan F *et al* (2000) Sugarcane yellow leaf luteovirus: An emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology* 269: 156-171
- Morales FJ and Anderson P (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146: 415-441
- Mise K *et al* (1993) Bromovirus movement proteins play a crucial role in host specificity. *J. Virol.* 67: 2815-2823
- Nagy PD and Bujarski JJ (1992) Genetic recombination in brome mosaic virus: effect of sequence and replication of RNA on accumulation of recombinants. *J. Virol.* 66: 6824-6828
- Nagy PD and Simon AE (1997) New insights into the mechanisms of RNA virus evolution. *Virology* 235: 1-9
- Padidam M *et al.* (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225
- Pigliucci M and Kaplan J (2000) The fall and rise of Dr. Pangloss: adaptationism and the spandrels paper 20 years later. *TREE* 15: 66-69
- Power AG (2002) Ecological risks of virus-resistant crops. In: Genetically engineered organisms: assessing environmental and health effects. Eds Latourneau and Burrows. CRC press
- Pruss G *et al* (1997) Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9: 859-868
- Revers F *et al* (1996) Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *J. Gen. Virol* 77: 1953-1965
- Robinson DJ. (1996). Environmental risk assessment of releases of transgenic plants containing virus-derived inserts. *Transgenic Res.* 5: 359-62
- Roossinck MJ (1997) Mechanisms of plant virus evolution. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35: 191-209
- Rubio T; Borja M; Scholthof HB; Jackson AO (1999) Recombination with host transgenes and effects on virus evolution: An overview and opinion. *MPMI* 12: 87-92
- Ryabov E *et al* (2001) Umbravirus gene expression helps potato leaf roll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology* 286: 363-372
- Rybicki E and Pietersen G (1999) Plant virus disease problems in the developing world. *Adv. Virus. Res.* 53:127-164
- Sackey ST and Francki RIB (1990) Interaction of cucumoviruses in plants: persistence of mixed infections of cucumber mosaic virus and tomato aspermy viruses. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 36: 409-419
- Schoelz JE, Wintermantel WM. (1993) Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell* 5: 1669-79
- Schwartz M *et al* (2002) A positive strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol. Cell* 9: 505-514
- Simon AE and Bujarski J (1994) RNA-RNA recombination in virus-infected plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32: 337-362
- Solovyev A *et al* (1996) Movement of a barley stripe mosaic virus chimera with a tobacco mosaic virus movement protein. *Virology* 217 435-441
- Sunter G *et al* (2001) Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or Beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* 285: 59-70
- Tepfer M 1993. Viral genes and transgenic plants: What are the potential environmental risks? *Bio/Technology* 11: 1125-1132
- Tepfer M (2002) Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 467
- UCS (1994) Union of concerned scientists on a transgenic virus-resistant squash <http://www.ucsus.org/agriculture/usda.jul94.html>
- USDA (1994) Docket No. 92-127-4 Environmental Assessment and finding of no significant impact for ZW-20 squash
- Varrelmann M; Palkovics L; Maiss E (2000) Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of Plum pox virus. *J. Virol.* 74: 7462-7469
- Voinnet O *et al.* (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14147-52
- Weiland J and Edwards M (1996) A single nucleotide substitution in the alpha a gene confers oat pathogenicity to barley stripe mosaic virus strain ND18. *MPMI* 9: 62-67
- Wintermantel WM, Schoelz JE (1996) Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* 223: 156-164
- Zhou *et al* (1997) Evidence that the DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic virus disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen Virol.* 78: 2101-2111
- De Zoeten GA (1991). Risk assessment: Do we let history repeat itself? *Phytopathology* 81: 585-86