

Cuaderno Técnico n° 1

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LA SOJA

ROUNDUP READY®, EVENTO 40-3-2



INDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	6
Caracterización molecular de la soja Roundup Ready®.....	9
Niveles de la proteína CP4 EPSPS en las plantas de soja Roundup Ready®.....	11
Evaluación de la seguridad de la proteína CP4 EPSPS.....	12
Análisis de la composición y valoración nutricional de la soja Roundup Ready®.....	17
Evaluación medioambiental.....	27
Conclusiones.....	33
Bibliografía.....	34

RESUMEN

Gracias a la moderna biotecnología, la compañía Monsanto ha desarrollado variedades de soja Roundup Ready® tolerantes a glifosato, materia activa del herbicida Roundup®, mediante la producción de la proteína CP4 enolpiruvilsikimato-3-fosfato (EPSPS). La enzima EPSPS está presente en la ruta del ácido sikímico para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y microorganismos. La inhibición de esta enzima por el glifosato da lugar a una deficiencia en la producción de aminoácidos aromáticos y a una inhibición del crecimiento de las plantas. La ruta biosintética de aminoácidos aromáticos no está presente en las formas de vida de mamíferos, aves o fauna acuática, lo que explica la acción selectiva del glifosato en plantas y su baja toxicidad en mamíferos.

Utilizando como método de transferencia la aceleración de partículas, la soja Roundup Ready evento 40-3-2 se obtuvo al introducir, en el genoma de la soja, la secuencia que codifica la expresión de la proteína CP4 EPSPS, la cual presenta una tolerancia natural al glifosato. La proteína CP4 EPSPS se obtuvo de una bacteria común del suelo, y pertenece a la clase de proteínas EPSPS, encontrada con ubicuidad en plantas y microorganismos.

La tolerancia de la soja Roundup Ready al herbicida Roundup ha sido demostrada desde 1991 en pruebas de campo llevadas a cabo en Estados Unidos y desde 1996 con producción comercial en Estados Unidos, Canadá y Argentina. Las variedades de soja Roundup Ready fueron sembradas en 1996 en menos del 5% de la superficie total de soja en Estados Unidos. En la campaña de 2000, el 54% de la superficie –aproximadamente 16 millones de hectáreas, de los 30 millones de hectáreas cultivados de soja en Estados Unidos– fue sembrada con variedades de soja Roundup Ready, y en Argentina, las variedades de soja Roundup Ready se cultivaron en cerca de 8 millones de hectáreas, lo que supone casi un 95% de adopción.

A nivel global, la soja Roundup Ready representó alrededor de un 58% de los cultivos transgénicos cultivados en el año 2000. Una de las razones por la que los agricultores han acogido rápidamente la soja Roundup Ready es la sencillez que ofrece para el control de las malas hierbas. Considerando

que el herbicida Roundup es altamente eficaz contra la gran mayoría de las hierbas anuales y perennes y contra malas hierbas de hoja ancha, los agricultores que sembraron variedades de soja Roundup Ready han sido capaces de reducir el número de herbicidas usados para controlar las malas hierbas que crecen en sus campos, lo que supone un ahorro en los costes del control de las malas hierbas. Esta reducción en el uso de herbicidas ha beneficiado al medio ambiente al reducirse el número de aplicaciones de herbicida y también permite a los agricultores realizar un control integrado de las malas hierbas en sus campos, más difícil de implementar cuando se utilizan herbicidas de efecto residual aplicados antes de la siembra, o en preemergencia del cultivo. También ha facilitado la adopción de la agricultura de conservación, reduciendo el laboreo mecánico y emisiones de CO₂, y manteniendo sobre el suelo los restos vegetales para evitar la erosión.



Campo de soja Roundup Ready en siembra directa.

La seguridad de la soja Roundup Ready para alimentos y piensos, así como su seguridad ambiental ha sido establecida basándose en: la similitud funcional y estructural de la proteína CP4 EPSPS con las diversas proteínas de la familia EPSPS, que normalmente se encuentran en alimentos y derivados obtenidos a partir de plantas tradicionales y de fuentes microbianas; la baja exposición dietética a las proteínas CP4 EPSPS; la ausencia de toxicidad de las proteínas EPSPS en general y en estudios con la CP4 EPSPS en particular.

Además, la equivalencia nutricional y las propiedades saludables de la soja Roundup Ready, comparada con la soja convencional, fueron demostradas mediante el análisis de los nutrientes principales, incluyendo la composición centesimal, aminoácidos, ácidos grasos así como antinutrientes. La equivalencia de la soja Roundup Ready con la soja convencional se confirmó en numerosos estudios de alimentación animal con ratas, vacas, pollos, siluros y codornices. Los estudios también confirman que la soja Roundup Ready no produce efectos negativos para el medio ambiente. Los resultados de estos estudios demuestran que la soja Roundup Ready es tan segura como la soja tradicional en cuanto a su uso como alimento o pienso y en cuanto a la su seguridad medioambiental.

INTRODUCCIÓN

La producción agrícola actual se basa en el cultivo de un número reducido de especies vegetales, domesticadas por el hombre a lo largo de muchos siglos. Esta domesticación consiste en una serie de modificaciones genéticas naturales, que el hombre ha seleccionado de forma empírica, seguidas de nuevas modificaciones buscadas y obtenidas mediante cruzamientos dirigidos, hibridaciones o mutaciones, que en diferentes cultivos se utilizan y consumen sin problemas. La seguridad de los alimentos derivados de las plantas modificadas convencionalmente se basaba más en las observaciones durante su consumo, que en un estudio científico antes de su puesta en el mercado.

Monsanto ha desarrollado plantas de soja Roundup Ready, que presentan tolerancia al herbicida Roundup. El principal mecanismo de acción del glifosato, materia activa del herbicida Roundup, es la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Esta enzima forma parte de la ruta del ácido sikímico implicado en la producción de aminoácidos aromáticos y otros componentes aromáticos en plantas (Steinrucken y Amrhein, 1990). Cuando las plantas tradicionales son tratadas con glifosato, no pueden producir los aminoácidos aromáticos necesarios para su supervivencia. Las variedades de soja Roundup Ready desarrolladas mediante la biotecnología moderna, expresan la proteína CP4 EPSPS, la cual se obtuvo de una bacteria común del suelo. La proteína CP4 EPSPS es, de forma natural, mucho menos sensible a la inhibición por el glifosato y de este modo, las plantas que expresan esta proteína son tolerantes al herbicida Roundup.

El herbicida Roundup se utiliza como herbicida de aplicación foliar y es eficaz contra la mayoría de las hierbas anuales y perennes, ya sean de hoja estrecha o de hoja ancha. El glifosato no presenta actividad residual en el suelo (Franz y otros, 1997). Además esta materia activa no es propensa a lixiviarse, se biodegrada en el suelo con el tiempo y presenta una toxicidad mínima para mamíferos, aves y peces (U.S. EPA, 1993; WHO, 1994; Giesy y otros, 2000; Williams y otros, 2000).

La soja Roundup Ready ofrece a los agricultores una herramienta adicional para mejorar el control de las malas hierbas. El control de las malas hierbas en los cultivos de soja es esencial, ya que éstas compiten con el cultivo

para conseguir luz del sol, agua y nutrientes. Un fracaso en el control de las malas hierbas dentro del cultivo supondría un descenso del rendimiento de la cosecha y una reducción de la calidad de las habas de soja. Además, las malas hierbas dificultan la recolección mecánica del cultivo.

La tolerancia de la soja Roundup Ready al herbicida Roundup ha sido demostrada desde 1991 en pruebas de campo llevadas a cabo a lo largo de Estados Unidos y desde 1996 con amplia producción comercial en Estados Unidos, Canadá y Argentina. Las variedades de soja Roundup Ready fueron sembradas en 1996, en menos del 5% de la superficie total de soja en Estados Unidos. En la campaña del 2000, el 54% de la superficie de este cultivo –aproximadamente 16 millones de hectáreas de los 30 millones de hectáreas cultivadas con soja en Estados Unidos– fue sembrada con variedades de soja Roundup Ready, y en Argentina, la soja Roundup Ready fue cultivada en cerca de 8 millones de hectáreas, lo que supone casi un 95% de adopción (James, 2000). En general, la soja Roundup Ready representó alrededor de un 58% de los cultivos transgénicos cultivados en el año 2000. Una de las razones por la que los agricultores han acogido rápidamente la soja Roundup Ready es la sencillez que ofrece para el control de las malas hierbas. Considerando que el herbicida Roundup es altamente eficaz contra la gran mayoría de las malas hierbas anuales y perennes, de hoja estrecha y de hoja ancha, los agricultores que sembraron la soja Roundup Ready han sido capaces de reducir el número de herbicidas usados para controlar las malas hierbas que crecen en sus campos, lo que supone un ahorro en los costes del control de las malas hierbas. Esta reducción en el uso de herbicidas ha beneficiado al medio ambiente al reducirse el número de tratamientos, permitiendo a los agricultores realizar un control integrado y eficaz de las malas hierbas en sus campos, prácticas que generalmente son más difíciles de implementar cuando se utilizan herbicidas mezclados con el suelo antes de la siembra, o de efecto residual preventivo, en preemergencia del cultivo.

La soja Roundup Ready ha proporcionado los siguientes beneficios medioambientales y económicos:

- Mejora de la eficacia en el control de malas hierbas comparándola con programas de herbicidas usados en soja convencional, ya que los herbicidas preemergentes específicos, usados como prevención, son sustituidos por un herbicida post-emergente de amplio

espectro, que puede ser usado cuando hace falta (Culpepper y York, 1998; Roberts y otros, 1999). La introducción de la soja Roundup Ready en Estados Unidos ha eliminado 19 millones de aplicaciones de herbicida por año —un descenso del 12%, incluso a pesar de que la superficie de soja se ha incrementado en un 18%, desde 1996 hasta 1999 (Carpenter, 2001). Este descenso en las aplicaciones de herbicida significa que los agricultores necesitaron tratar menos sus campos, lo que supone un manejo más fácil del cultivo y ahorro de combustible.

- Una reducción de los costes de herbicidas para el agricultor. Se ha estimado que en Estados Unidos los agricultores de soja han ahorrado 216 millones de dólares en 1999 con respecto a 1995, el año anterior al que la soja Roundup Ready fuera introducida, incluso teniendo en cuenta el mayor precio de la semilla (Carpenter, 2001).
- Alta compatibilidad con las técnicas de Control Integrado de Malas Hierbas y de conservación del suelo (Keeling y otros, 1998, FAO/ECAF, 2001), dando lugar a un número de importantes beneficios medioambientales que incluyen una reducción de la erosión del suelo, una mejora de la calidad del agua (Baker y Lafflen, 1979; Hebblethwaite, 1995; CTIC, 1998), una mejora en la estructura del suelo con mayor cantidad de materia orgánica, (Kay, 1995; CTIC, 2000), mejora en la captación de carbono (Reicosky, 1995; Reicosky y Lindstrom, 1995) y una reducción de las emisiones de CO₂ (Kern y Johnson, 1993; CTIC, 2000).

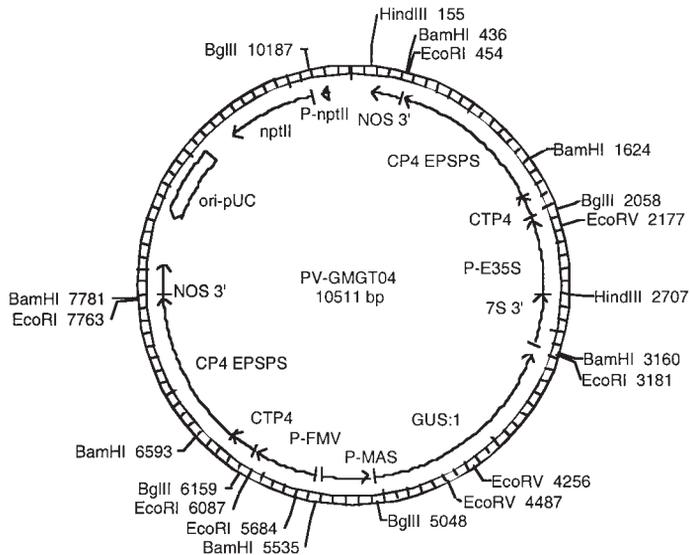
En resumen, las malas hierbas son una severa restricción para la producción mundial de soja. La soja no puede competir con ellas en sus primeras fases de crecimiento y debe ser protegida de la invasión de malezas agresivas. Los sistemas actuales de control combinan el uso de técnicas culturales y mecánicas con herbicidas, para superar el efecto competitivo. La introducción de la soja Roundup Ready ha supuesto una reducción en el número y los costes de las aplicaciones de herbicidas, dando como resultado un control igual o incluso mejor de las malas hierbas. El uso de la soja Roundup Ready también ofrece beneficios medioambientales asociados a la agricultura de conservación y a las prácticas integradas de control de malas hierbas.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA SOJA ROUNDUP READY

La línea de soja Roundup Ready 40-3-2 se desarrolló mediante la introducción de la secuencia que codifica la proteína CP4 EPSPS, en la variedad de soja A5403, variedad de soja comercial de la Compañía de Semillas Asgrow. A5403 es una variedad cultivada del grupo de madurez V, que combina un alto rendimiento potencial con resistencia a las fases 3 y 4 de los quistes del nemátodo de la soja (SCN). También posee buen porte, excelente nascencia y tolerancia a muchas enfermedades de hojas y tallos. Posteriormente, la característica Roundup Ready ha sido transferida a más de mil variedades comerciales de soja, por técnicas de mejora tradicional.

La línea de soja Roundup Ready 40-3-2 se obtuvo utilizando la aceleración de partículas como método de transformación (McCabe y otros, 1988; Christou y otros, 1988) a partir de la línea parental de soja A5403 no transgénica, utilizando ADN obtenido del plásmido PV-GMGT04 (Figura 1).

Figura 1. Mapa del plásmido PV-GMGT04 utilizado para producir la soja Roundup Ready, evento 40-3-2.



La inserción primaria del ADN, obtenida del plásmido PV-GMGT04, incluye una copia sencilla de la cassette *cp4 epsps* con: el promotor E35S, las secuencias que codifican el péptido de transición al cloroplasto y la proteína CP4 EPSPS, y el terminador de transcripción *nos 3'*. La secuencia que codifica la CP4 EPSPS incluye los codones de inicio y terminación de traducción, codificando los 456 aminoácidos que dan lugar a la síntesis de la proteína funcional CP4 EPSPS de 46 kDa en su totalidad, cuya presencia en la soja Roundup Ready 40-3-2 se ha confirmado mediante transferencia Western, ensayos ELISA y ensayos de actividad enzimática EPSPS (Padgett y otros, 1995; Re y otros, 1993; Padgett y otros, 1994; USDA, 1994; Harrison y otros, 1996; Padgett y otros, 1996^a).

Además de la inserción funcional primaria, la soja Roundup Ready, evento 40-3-2, contiene dos pequeños segmentos insertados de ADN: un segmento con 250 pares de bases de ADN *cp4 epsps* adyacentes al elemento de terminación de transcripción *nos 3'* y un segmento de 72 pares de bases de ADN *cp4 epsps* que se co-segrega con la inserción principal. La ausencia de funcionalidad de estos dos pequeños segmentos se confirmó por la ausencia de ARN mensajero detectable y por la ausencia de proteínas, con base en 1) análisis de transferencia Northern y PCR RT, los cuales demostraron la ausencia de transcripción detectable de cualquiera de los dos segmentos, y 2) análisis de transferencia Western, en el cual sólo se detectó la proteína esperada de longitud completa, codificada por el gen funcional *cp4 epsps* insertado.

Las inserciones se heredan según el patrón Mendeliano esperado y su estabilidad ha sido demostrada a través del análisis molecular desde la generación R3 hasta la R6 de la línea 40-3-2. Además, la soja Roundup Ready derivada de la línea 40-3-2 se ha utilizado comercialmente en más de 40 millones de hectáreas sembradas desde 1996, mostrando un comportamiento consistente.

NIVELES DE LA PROTEÍNA CP4 EPSPS EN LAS PLANTAS DE SOJA ROUNDUP READY

Se ha desarrollado y optimizado un método de análisis inmuno-enzimático ELISA (Harlow y Lane, 1988), para cuantificar niveles de proteína CP4 EPSPS en muestras procedentes de hojas y semillas de soja (Padgett y otros, 1995; Rogan y otros, 1999). En la Tabla 1, se representan los niveles de proteína encontrados en semillas y tejidos foliares de soja Roundup Ready, que fueron tratados o no con el herbicida Roundup, en campos de ensayo de EEUU, en 1992 y 1993 (Padgett y otros, 1995).

Tabla 1. Niveles de proteína CP4 EPSPS (μg de proteína/mg de peso de tejido fresco) en semillas y tejido foliar de soja Roundup Ready (40-3-2) y el control parental (A5403).

Año/tejido	A5403			40-3-2			
				Tratado			
				No tratado			
1992 (6 localidades)				1992 (9 localidades)			
Semilla	media	ND ²	0.301	Semilla	media	ND	0.288
	rango	NA ³	0.258-0.378		rango	NA	0.186-0.395
	DS	NA	0.03		DS	NA	0.066
1993 (4 localidades)				1993 (4 localidades)			
Semilla	media	ND	0.218	Semilla	media	ND	0.201
	rango	NA	0.166-0.287		rango	NA	0.127-0.277
	DS	NA	0.042		DS	NA	0.017
Hoja ¹	media	ND	0.489	Hoja	media	ND	0.415
	rango	NA	0.308-0.856		rango	NA	0.299-0.601
	DS	NA	0.239		DS	NA	0.153

¹ Las muestras de hojas fueron recolectadas en tres de las cuatro localidades.

² ND, no detectable. La media y la desviación típica (DS) no está calculada porque la proteína CP4 EPSPS no fue detectada en los extractos de A5403.

³ NA, no aplicable.

El valor medio de proteína CP4 EPSPS en semilla de soja en las pruebas de 1992 fue 0.301 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco de planta, tratada con el herbicida Roundup y 0.288 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco de plantas no tratadas. El valor medio en semillas de los ensayos de 1993 fue 0.218 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco en las plantas tratadas con herbicida Roundup y 0.201 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco en las plantas que no fueron tratadas. Este nivel de proteínas CP4 EPSPS en las semillas representa aproximadamente el 0.08% del total de proteína en la semilla. Los niveles medios de proteína CP4 EPSP en los tejidos foliares de la soja, en los ensayos de 1993, fueron 0.489 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco en plantas tratadas con el herbicida Roundup y 0.415 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco en las plantas no tratadas con el herbicida Roundup.

Como se esperaba, la proteína CP4 EPSPS no fue detectada ni en los tejidos de semillas ni en las hojas de la soja de la variedad parental no transgénica A5403, en ninguno de los años, considerando el límite de detección del método analítico.

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LA PROTEÍNA CP4 EPSPS

La evaluación de la seguridad de la proteína CP4 EPSPS producida en la soja Roundup Ready evento 40-3-2 incluye la caracterización de la proteína, comparación funcional y estructural de la proteína CP4 EPSPS con las proteínas EPSPS que se encuentran en plantas y microorganismos con antecedentes de seguridad en su consumo, estudio de su digestibilidad *in vitro* en fluidos que simulan los medios gástricos e intestinales, toxicidad oral aguda en ratones y comparación de sus aminoácidos con los de toxinas y alérgenos conocidos.

Caracterización de la proteína CP4 EPSPS

La proteína CP4 EPSPS producida en la soja Roundup Ready es funcionalmente similar a una diversa familia de proteínas EPSPS, encontradas normalmente en alimentos y piensos, obtenidos de fuentes vegetales y microbianas (Levin y Sprinson, 1964; Harrison y otros, 1996). Las proteínas EPSPS son necesarias para la producción de aminoácidos aromáticos en

plantas y microorganismos. Los genes que codifican numerosas proteínas EPSPS han sido clonados (Padgett y otros, 1988, 1991 y referencias contenidas en este), y los dominios activos se conservan en las distintas proteínas EPSPS conocidas (Padgett y otros, 1988, 1991). Las proteínas EPSPS bacterianas han sido bien caracterizadas con rayos X con respecto a su estructura cristalina tridimensional (Stallings y otros, 1991), y respecto a sus cinéticas y mecanismos químicos de reacción (Anderson y Jonson, 1990). La enzimología y la función conocida de las proteínas EPSPS en general y de las proteínas CP4 EPSPS en particular, supone que esta clase de enzimas tiene un papel bioquímico bien descrito y entendido en las plantas.

Desde la perspectiva de la seguridad, esta caracterización demuestra que el efecto metabólico de la expresión de las proteínas CP4 EPSPS está limitado a conferir tolerancia al herbicida Roundup. Parte de esta evaluación incluye la relación estructural de la proteína CP4 EPSPS con otras proteínas EPSPS encontradas en alimentos, la comparación de las secuencias de aminoácidos con identidad conservada respecto a los residuos de los sitios activos, la conservación de la estructura tridimensional basándose en la similitud de la secuencia de aminoácidos y el hecho de que las proteínas EPSPS catalizan un paso no limitado por la dosis, en la ruta de la síntesis de aminoácidos aromáticos (por lo tanto, un aumento en el nivel de proteínas EPSPS no debería afectar al flujo de la ruta de aminoácidos aromáticos). En relación con la secuencia de aminoácidos, hay considerables divergencias entre las proteínas EPSPS, ya conocidas. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS tiene un 41% de similitud con respecto al nivel de aminoácidos de la proteína EPSPS del *Bacillus subtilis*, mientras que la proteína EPSPS de la soja tiene un 30% de similitud. De este modo, las divergencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la típica proteína EPSPS alimenticia, están en el mismo rango de las divergencias existentes dentro de las propias proteínas EPSPS (Harrison y otros, 1996).

El estudio de la actividad enzimática (Harrison y otros, 1996) y las evaluaciones bioquímicas de composición de la proteína CP4 EPSPS (Padgett y otros, 1996a) confirman que tiene el efecto metabólico previsto al expresarse en la soja Roundup Ready: la producción de aminoácidos aromáticos mediante la ruta biosintética del ácido sikímico.

Digestibilidad in vitro de la proteína CP4 EPSPS

Para valorar la susceptibilidad de la proteína CP4 EPSPS a la digestión proteolítica, se realizaron ensayos *in vitro* usando fluidos digestivos gástricos e intestinales semejantes a los de los mamíferos. Una rápida degradación de la proteína se corresponde con una exposición limitada en el tracto gastrointestinal y con una baja probabilidad de que la proteína pueda producir efectos farmacológicos, tóxicos o alergénicos. El método de preparación de las soluciones digestivas simuladas usadas viene descrita en la Farmacopea de Estados Unidos (1989).

La proteína CP4 EPSPS es rápidamente digerida en el sistema digestivo *in vitro* (Harrison y otros, 1996). Se han utilizado la actividad enzimática y los análisis con inmunotransferencias para monitorizar la degradación de la proteína CP4 EPSPS y demostrar que la vida media de la proteína en el fluido gástrico simulado es menor de 15 segundos y menos de 10 minutos en el fluido intestinal simulado. Para tener una idea de la rápida degradación de la proteína CP4 EPSPS en el sistema gástrico simulado, se ha estimado que los alimentos sólidos tardan cerca de 2 horas en vaciar el 50% del estómago humano, mientras que el 50% del líquido ingerido sale del estómago en aproximadamente 25 minutos (Sleisenger y Fordtran, 1989). Si la proteína CP4 EPSPS no fuera degradada en el sistema gástrico, sería rápidamente degradada en el intestino. Es improbable que las proteínas que son rápidamente degradadas en el tracto gastrointestinal sean capaces de conferir toxicidad o capacidad alergénica (Astwood y otros, 1996; Astwood y Fuchs, 2000).

Evaluación de la toxicidad oral aguda de la proteína CP4 EPSPS, en ratones

Pocas proteínas son tóxicas cuando se ingieren, y aquellas que son tóxicas, normalmente actúan de forma aguda (Sjoblad y otros, 1992). Para confirmar la ausencia de toxicidad aguda o cualquier toxicidad potencial asociada con esta proteína se realizó un estudio de toxicidad por vía oral en ratones, utilizando la proteína CP4 EPSPS como sustancia a evaluar (Harrison y otros, 1996). La administración aguda (en una sola vez), fué considerada suficiente para valorar la seguridad de la proteína CP4 EPSPS, puesto que las proteínas tóxicas actúan mediante mecanismos agudos. No se detectó ningún efecto adverso relacionado con el tratamiento en los ratones a los que se les

administró la proteína CP4 EPSPS por vía oral, a dosis de hasta 572 mg/kg de peso corporal. Esta dosis representa un margen de seguridad significativo –más de 1.000 veces superior– en relación al máximo consumo humano potencial de proteína CP4 EPSPS y suponiendo que la proteína se expresa en múltiples cultivos (Harrison y otros, 1996). Los resultados de este estudio demostraron que la proteína CP4 EPSPS no es un tóxico agudo en mamíferos. Este resultado era el esperado, dado que la proteína CP4 EPSPS es digerida rápidamente en fluidos gástricos e intestinales *in vitro* y que la proteína pertenece a una familia de proteínas con un historial seguro de consumo y sin mecanismos biológicos plausibles de toxicidad en animales.

Evaluación de homología estructural de la proteína CP4 EPSPS, con proteínas tóxicas conocidas

Otro aspecto usado para la valoración del efecto potencialmente tóxico de proteínas introducidas en plantas es comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína con la secuencia de proteínas tóxicas conocidas. Las proteínas homólogas, derivadas de un ancestro común, tienen una secuencia de aminoácidos similar y a menudo comparten funciones comunes. Por lo tanto, no es recomendable introducir ADN que codifique una proteína que sea homóloga a una proteína tóxica para animales y humanos. La homología se determina comparando el tanto por ciento de aminoácidos similares entre proteínas, usando criterios publicados (Doolittle y otros, 1990). La proteína CP4 EPSPS no muestra similitud significativa en la secuencia de aminoácidos, en comparación con toxinas proteicas conocidas.

Evaluación del potencial alergénico de la proteína CP4 EPSPS

Aunque no hay bioensayos predictivos disponibles para evaluar el potencial alergénico de proteínas en humanos (FDA, 1992), las características fisicoquímicas y los perfiles de exposición en humanos de las proteínas, proporcionan una base para valorar la capacidad alergénica potencial comparándolo con alérgenos proteicos conocidos. Así, aspectos importantes para evaluar la capacidad alergénica de proteínas ingeridas vía oral incluyen la exposición y evaluación de los factores que contribuyen a esa exposición, que son entre otros, su estabilidad durante la digestión, la cantidad presente en los alimentos y el patrón de consumo (cantidad) del alimento específico (Metcalfe y otros, 1996; Kimber y otros, 1999).

Un parámetro clave que contribuye a la capacidad alergénica sistémica de ciertas proteínas de los alimentos parece ser la estabilidad a las condiciones pépticas y ácidas del sistema digestivo (Astwood y otros, 1996; Astwood y Fuchs, 1996; Fuchs y Astwood, 1996; FAO, 1996; Kimber y otros, 1999). Los alérgenos proteicos importantes tienden a ser estables a la digestión péptica y a las condiciones ácidas del estómago, para alcanzar la mucosa intestinal, donde puede iniciarse una respuesta inmune adversa. Como se indica anteriormente, la valoración *in vitro* de la digestibilidad de la proteína CP4 EPSPS indica que la proteína, como otras proteínas que se encuentran en los alimentos, es muy lábil a la digestión cuando se la compara con muchos alérgenos clínicamente importantes, presentes en los alimentos.

Otro factor significativo que contribuye a la capacidad alergénica de ciertas proteínas de alimentos es su alta concentración (Taylor, 1992; Taylor y otros, 1987; Fuchs y Astwood, 1996). La mayoría de los alérgenos están presentes como componente proteico importante del alimento en cuestión, en cantidades del 1 al 80% del total de sus proteínas (Fuchs y Astwood, 1996). En cambio, la proteína CP4 EPSPS está presente en niveles bajos, aproximadamente el 0.08% del total de proteínas presentes en las semillas de soja (Tabla I; Padgett y otros, 1995). Además, se ha demostrado que en el proceso de producción de aceite de soja, una de las principales fuentes de soja en la dieta humana, se reduce la gran mayoría de estas proteínas, de forma que el aceite de soja refinado no desencadena reacciones alérgicas, en personas sensibles a la soja (Bush y otros, 1995).

También es importante establecer que la proteína no es similar a alérgenos descritos previamente, ni a parte de secuencias de aminoácidos potencial e inmunológicamente relevantes, ni a estructuras de alérgenos conocidos. Una forma eficiente de determinar si las proteínas añadidas son alergénicas o si es probable que contenga estructuras que produzcan una reacción cruzada, es comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína introducida con las secuencias de todos los alérgenos conocidos. Las secuencias de proteínas asociadas a alergias o a la enfermedad celíaca se han recopilado en bases de datos, disponibles para el público (GenBank, EMBL, PIR y SwissProt). La secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS fue comparada con estas secuencias y se vio que no había secuencias de aminoácidos similares de forma significativa con ninguno de los alérgenos conocidos (Fuchs y Astwood, 1996).

Finalmente, se realizó una evaluación de los alérgenos endógenos de la soja convencional y de la soja Roundup Ready usando suero de pacientes sensibles a las proteínas de la soja. Este estudio demostró que la introducción de la proteína CP4 EPSPS no causó cambios discernibles, cualitativa ni cuantitativamente, en la composición de las proteínas alérgicas endógenas de la soja (Burks y Fuchs, 1995).

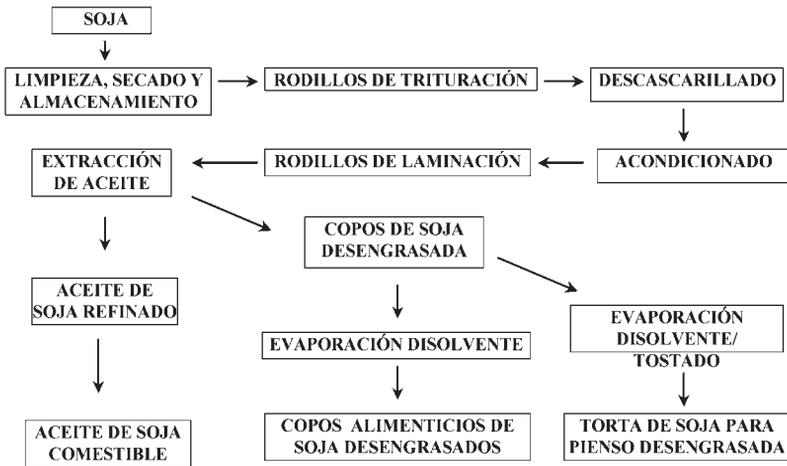
En resumen, por su función conocida, por la ubicuidad de la proteína EPSPS y por estudios directos con la proteína CP4 EPSPS, se ha demostrado que esta proteína no representa un nuevo riesgo en los alimentos que la contienen. Los resultados muestran que no hay indicios de toxicidad de la proteína CP4 EPSPS, tomando como medida los efectos adversos relacionados con el tratamiento en los ratones con administración oral de la proteína CP4 EPSPS. Esta ausencia de toxicidad era esperable, dada la rápida degradación de la proteína CP4 EPSPS y de su actividad enzimática en fluidos gástrico e intestinal simulados. Además, la proteína CP4 EPSPS no presenta homología con proteínas tóxicas o alérgenos conocidos y se encuentra en concentraciones muy bajas, en la soja Roundup Ready. Por otra parte, esta proteína pertenece a una familia de proteínas con un largo historial de consumo seguro.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN Y VALORACIÓN NUTRICIONAL DE LA SOJA ROUNDUP READY

La soja y sus usos

El diseño de un programa de evaluación de la seguridad de alimentos y piensos obtenidos de cultivos modificados genéticamente implica una detallada comprensión de los usos del cultivo y de los productos derivados para alimentación humana y animal. La soja, *Glycine max*, es una de las mayores fuentes del mundo de proteína y aceite vegetal. El diagrama siguiente describe como la semilla de soja se procesa para la obtención de aceite y productos alimenticios.

Normalmente, un “bushel” (medida volumétrica) de soja de 60 libras produce 48 libras de torta rica en proteína y 11 libras de aceite (Asociación



Americana de la Soja, 1999). El principal uso de la soja tostada desengrasada es en alimentación animal (97%). La principal fracción usada en la industria alimentaria es el aceite de soja, el cual se utiliza para la obtención de margarinas, y aceites para masas, para cocinar y para ensaladas. La lecitina, un fosfolípido que se elimina del aceite de soja crudo, se usa como emulsificante natural, lubricante y agente estabilizador. Los copos de soja también son usados en distintos productos alimenticios, incluyendo tofu, salsa de soja, y sucedáneos de leche y productos cárnicos. Pocos alimentos incluyen la soja sin procesar, ya que contiene de manera natural inhibidores de la tripsina, los cuales actúan como anti-nutrientes, si la soja no es adecuadamente tratada con calor, durante su preparación. Los usos industriales de la soja van desde la producción de levaduras y anticuerpos a la fabricación de jabones y desinfectantes.

Análisis de la composición

El análisis de la composición es un factor crítico en un proceso de valoración de seguridad integrado, como el descrito anteriormente (Astwood y Fuchs, 2000). Cada uno de los parámetros medidos, proporciona una evaluación de numerosos resultados acumulativos relativos a las rutas bioquímicas, y por tanto proporciona información para valorar una amplia gama de vías metabólicas dentro de la planta. Las comparaciones de

nutrientes y anti-nutrientes se han realizado con alimentos de una variedad tradicional muy similar; así como con el rango establecido para cada componente específico dentro de este cultivo, comparando con los niveles de variación natural dentro de las variedades convencionales de soja.

Se han realizado extensos estudios relativos a la composición de la soja Roundup Ready, línea 40-3-2, y los resultados han sido publicados (Delannay y otros, 1995; Padgette y otros, 1995; Padgette y otros, 1996; Taylor y otros, 1999; List y otros, 1999). Los resultados obtenidos en más de 1.400 análisis individuales realizados indican que la composición de la soja Roundup Ready es substancialmente equivalente a la variedad de soja control no transgénica y a otras variedades de soja comerciales. Los análisis realizados incluían:

- Composición centesimal: proteínas, grasas, fibra, cenizas, carbohidratos y agua.
- Anti-nutrientes: inhibidores de tripsina, lectinas, fitoestrógenos (genisteína y daidzeína), estaquiosa, rafinosa y fitato.
- Perfil de ácidos grasos: proporciones de ácidos grasos individuales.
- Composición de aminoácidos: niveles de aminoácidos individuales.

En la Tabla 2, se muestran los resultados de la composición centesimal de la semilla de soja Roundup Ready y del control parental no transgénico. Estos análisis se han realizado en soja cultivada en seis localidades de Estados Unidos, en 1992 y cuatro localidades, en 1993; las plantas de soja Roundup Ready fueron tratadas con el herbicida Roundup. No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la composición (proteínas, cenizas, agua, aceites, fibras y carbohidratos) entre la soja Roundup Ready y el control A5403, al nivel del 5%, confirmándose que los niveles de estos compuestos en la soja Roundup Ready son comparables a los de la soja convencional (Taylor y otros, 1999).

Los análisis de la composición en aminoácidos de las semillas de soja Roundup Ready y de la soja A5403 se realizaron en la soja cosechada en Estados Unidos en 1993 (Tabla 3). Los niveles de aminoácidos, incluyendo los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), fueron comparados entre los dos tipos de semillas no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ningún aminoácido, al nivel del 5% (Taylor y otros, 1999).

Tabla 2. Resumen de la composición centesimal de la semilla de soja Roundup Ready tratada con glifosato (40-3-2) y semillas¹ de soja control (A5403). Resultados de los ensayos de campo en 1992 y 1993.

Características ²	A5403 media	A5403 rango ³	A5403 SEM	40-3-2 media	40-3-2 rango	40-3-2 SEM	Rango en la literatura
1992							
(6 localidades) ⁴							
proteínas	41.01	37.46-44.90	0.37	40.35	36.42-44.71	0.37	36.9-46.4 ⁶
cenizas	5.18	4.61-5.52	0.07	5.34	4.73-5.91	0.07	4.61-5.37 ⁶
humedad	12.68	11.10-14.30	1.28	10.56	7.67-22.65	1.28	7-11 ^{6,7}
grasa	19.8	17.40-21.84	0.23	20.41	18.19-22.19	0.23	13.2-22.5 ^{6,8}
fibra	6.35	5.86-6.52	0.15	6.44	6.13-7.11	0.15	4.7-6.48 ^{6,9}
carbohidratos	34.01	32.36-35.26	0.24	33.86	32.11-35.73	0.24	30.9-34.0 ^{6,10}
1993							
(4 localidades) ⁵							
proteínas	41.4	40.39-42.32	0.451	41.43	39.35-44.14	0.451	36.9-46.4 ⁶
cenizas	5.31	5.01-5.94	0.052	5.35	5.04-5.81	0.052	4.61-5.37 ⁶
humedad	5.73	5.18-6.19	0.137	5.74	5.32-6.20	0.137	7-11 ^{6,7}
grasa	19.89	18.67-20.57	0.353	20.53	19.01-22.17	0.353	13.2-22.5 ^{6,8}
fibra	7.36	6.63-8.10	0.145	6.86	5.59-7.66	0.147	4.7-6.48 ^{6,9}
carbohidratos	33.38	31.57-35.08	0.712	32.67	27.86-35.32	0.711	30.9-34.0 ^{6,10}

¹ La media indicada corresponde a un único ensayo en una muestra de una de las seis localidades en 1992 y cuatro localidades en 1993.

² Todos los valores indicados se expresan en porcentaje de peso seco, excepto para humedad.

³ Los rangos muestran los valores más bajos y más altos de cada ensayo.

⁴ Los campos de cultivo de soja Roundup Ready en 1992, fueron tratados con una aplicación de Roundup a 17,8 L/ha en preemergencia y otra aplicación en postemergencia temprana de 1.75 L/ha.

⁵ Los campos de cultivo de soja Roundup Ready de 1992 fueron tratados con una aplicación del herbicida Roundup en preemergencia, a 17.8 L/ha y otra en postemergencia, a 2.34 L/ha.

⁶ Smith and Circle (1972)

⁷ Perkins (1995)

⁸ Wilcox (1985)

⁹ Mounts y otros. (1987)

¹⁰ Orthoefer (1978)

Tabla 3. Resumen de la composición en aminoácidos de las semillas de soja Roundup Ready tratadas con glifosato y semillas de soja parentales de control^{1,2,3} (g/100 g de peso en seco). Campos de ensayos durante 1993, en EEUU.

aminoácidos	A5403 media	A5403 rango	A5403 SEM	40-3-2 media	40-3-2 rango	40-3-2 SEM	Rango en la literatura ³
Ac. Aspártico	4.50	4.30-4.59	0.063	4.51	4.21-4.75	0.063	3.87-4.98
Treonina	1.57	1.54-1.60	0.013	1.57	1.52-1.63	0.013	1.33-1.79
Serina	2.03	1.95-2.06	0.024	2.03	1.92-2.11	0.024	1.81-2.32
Ac. Glutámico	7.48	7.06-7.81	0.112	7.44	6.84-7.97	0.112	6.10-8.72
Prolina	2.07	1.97-2.16	0.023	2.06	1.91-2.16	0.023	1.88-2.61
Glicina	1.73	1.65-1.83	0.013	1.71	1.61-1.78	0.013	1.88-2.02
Alanina	1.73	1.66-1.79	0.012	1.72	1.67-1.76	0.012	1.49-1.87
Valina	1.94	1.87-1.97	0.019	1.93	1.83-2.00	0.019	1.52-2.24
Isoleucina	1.83	1.75-1.88	0.022	1.82	1.71-1.91	0.022	1.46-2.12
Leucina	3.09	2.96-3.16	0.037	3.06	2.90-3.19	0.037	2.71-3.20
Tirosina	1.39	1.34-1.41	0.012	1.38	1.32-1.44	0.012	1.12-1.62
Fenilalanina	2.01	1.92-2.06	0.015	1.98	1.86-2.08	0.015	1.70-2.08
Histamina	1.10	1.07-1.12	0.015	1.10	1.05-1.15	0.015	0.89-1.08
Lisina	2.63	2.53-2.69	0.021	2.64	2.53-2.76	0.021	2.35-2.86
Arginina	2.88	2.70-2.97	0.051	2.89	2.64-3.09	0.051	2.45-3.49
Cisteína	0.57	0.50-0.61	0.008	0.59	0.54-0.60	0.008	0.56-0.66
Metionina	0.54	0.48-0.50	0.009	0.54	0.51-0.55	0.009	0.49-0.66
Triptófano	0.49	0.48-0.50	0.012	0.49	0.47-0.53	0.012	0.53-0.54

¹ La media procede del análisis de una muestra de una de cuatro localidades en EEUU durante 1993. A5403 es la línea de control y 40-3-2 es la línea de soja Roundup Ready. Los campos de ensayo de soja Roundup Ready de 1992 fueron tratados con una aplicación en preemergencia a 17.8 L/ha y otra en postemergencia a 2.34 L/ha del herbicida Roundup.

² No se encontraron diferencias significativas entre la soja Roundup Ready (40-3-2) y la línea de control A5403 a un 5% de nivel de confianza (procedimiento SAS GLM).

³ Han y otros, 1991; Orthoefer, 1978.

En la Tabla 4 se muestra un resumen de los niveles de fitoestrógenos de las semillas de soja de las cosechas de 1993 en los campos de ensayo americanos. El rango total de genisteína y de daidzeína era variable según los distintos lugares de cultivo lo que se refleja en los valores obtenidos de las semillas de soja Roundup Ready y de A5403, utilizada como control. De cualquier modo, los niveles medios totales de genisteína y de daidzeína en la soja Roundup Ready son comparables a los de la soja A5403 de control, y a los niveles de isoflavonas descritos para la soja cultivada (Wang y otros, 1990). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con un nivel de confianza del 5% (Taylor y otros, 1999).

Tabla 4. Resultados de la composición en isoflavonas de semillas de soja Roundup Ready tratadas con glifosato y semillas de soja parentales de control¹ (g/100 g de peso en seco). Campos de ensayos durante 1993, en EEUU.

Isoflavonas	A5403 media	A5403 rango	A5403 SEM	40-3-2 media	40-3-2 rango	40-3-2 SEM	Rango en la literatura ⁷
Genisteína total ²	681	230-1086	38.152	742	196-1231	38.152	461.1-1000
Genisteína libre ³	20	14-28	NT	23	12-38	NT	
Genisteína fijada ³	662	210-1058	NT	719	172-1193	NT	
Daidzeína total ²	521	161-931	36.323	578	106-1064	36.323	330.6-706
Daidzeína libre ³	42	19-70	NT	42	20-86	NT	
Daidzeína fijada ³	479	142-862	NT	536	85-978	NT	
Cumestrol total ⁴	ND	NA ⁵	NT ⁶	ND	NA	NT	
Biocianina total ⁴	ND	NA	NT	ND	NA	NT	

¹ La media procede del análisis de una muestra de una de cuatro localidades en EEUU durante 1993. A5403 es la línea de control y 40-3-2 es la línea de soja Roundup Ready. Los campos de ensayo de soja Roundup Ready de 1993 fueron tratados con una aplicación en preemergencia a 17.8 L/ha y otra en postemergencia a 2.34 L/ha del herbicida Roundup.

² No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los contenidos de genisteína y daidzeína totales, entre la soja Roundup Ready (40-3-2) y la línea de control A5403, al nivel del 5% (procedimiento SAS GLM).

³ No se ha realizado la comparación estadística entre la soja Roundup Ready (40-3-2) y la línea control A5403 en cuanto a los contenidos de genisteína y la daidzeína libre y fijada.

⁴ Los niveles de cumestrol y biocianina debían estar por debajo de los límites de cuantificación (10 ppm) del método analítico empleado, por lo que se han considerado como "no detectables" (ND).

⁵ NA, no aplicable.

⁶ NT, no probado.

⁷ Pettersson, H. y K.H. Kiessling, 1984; Wang, G. y otros, 1990.

También se realizó el análisis de la composición de varias fracciones de soja procesada, incluyendo la torta de soja tostada, la torta no tostada y desengrasada, extractos de proteínas, concentrados de proteínas y aceites (Padgett y otros, 1996b). La soja Roundup Ready y el control A5403 procedentes de los campos de ensayo americanos de 1992 fueron procesadas de manera similar a los procedimientos comerciales, a escala más pequeña. Los resultados de la composición centesimal de la soja no tostada y desengrasada, extracto de proteínas y concentrado de proteínas se muestran en la Tabla 5. Los niveles de macronutrientes (proteínas, cenizas, grasa, fibra y carbohidratos) de estas fracciones, obtenidas a partir de la soja Roundup Ready fueron comparables a los niveles de las fracciones obtenidas a partir de la variedad parental de soja. La composición de ácidos grasos del aceite refinado, decolorado y desodorizado (RBDO), obtenido del aceite de la soja Roundup Ready, fue comparable al RBDO obtenido del aceite de la soja control (Tabla 6).

Tabla 5. Composición centesimal de la harina de soja no tostada y desengrasada, extracto de proteínas y concentrado de proteínas, obtenidas en ensayos de procesamiento de soja en EEUU, durante 1992¹. (g/100 g de peso seco, si no se indica otra cosa).

Componente	A5403	40-3-2	Rango en la literatura
Harina desengrasada (no tostada)			
Proteínas	53.2	53.6	40.0-59.0 ²
Cenizas	6.53	6.89	6.0-6.4 ³
Humedad, g/100g peso fresco	6.55	11.90	
Grasa	2.30	0.73	0.9-1.0 ⁴
Fibra	4052	4.23	2.5-4.5 ⁵
Carbohidratos	38.0	38.8	34.0-38.0 ⁶
Ureasa, pH	2.30	2.45	
Inhibidor de la tripsina, TIU ⁷ /mg peso seco	65.9	83.5	
Extracto de proteínas			
Proteínas	84.6	82.2	85.2-92.0 ⁸
Cenizas	3.30	3.89	2.3-7.6 ⁹
Humedad, g/100g peso fresco	4.77	5.26	
Grasa	1.06	1.68	0.1-2.5 ¹⁰
Fibra	<0.2	<0.2	0.1-0.4 ¹¹
Carbohidratos	11.0	12.2	0.3-0.6 ¹²
Concentrado de proteínas			
Proteínas	65.1	67.2	66.2-78.1 ¹³
Cenizas	4.91	5.91	4.7-6.5 ¹⁴
Humedad, g/100g peso fresco	9.36	5.31	
Grasa	5.27	4.47	0.9-2.0 ¹⁵
Fibra	4.60	2.80	2.8-5.0 ¹⁶
Carbohidratos	24.7	22.5	17.1-25.0 ¹⁷

¹ Los valores corresponden a un ensayo único. A5403 es la línea control y 40-3-2 es la línea de soja Roundup Ready.

² Smith y Circle, 1972; Wolf, 1983.

³ Fulmer, 1988; Smith y Circle, 1972.

⁴ Horan, 1974; Smith y Circle, 1972.

⁵ Fulmer, 1988; Sipos, 1988.

⁶ Sipos, 1988; Waggle y Kolar, 1979.

⁷ TIU = unidades de inhibidor de tripsina.

⁸ Torun, 1979; Waggle y Kolar, 1979.

⁹ Smith y Circle, 1972; Wolf, 1983.

¹⁰ Horan, 1974; Wolf, 1983.

¹¹ Smith y Circle, 1972; Wolf, 1983.

¹² Waggle y Kolar, 1979; Wolf, 1983.

¹³ Bookwalter, 1978; Smith y Circle, 1972.

¹⁴ O'Dell, 1979; Wolf, 1983.

¹⁵ Mattil, 1974; Wolf, 1983.

¹⁶ Mattil, 1974; Smith y Circle, 1972.

¹⁷ Rackis, 1974; Wolf, 1983.

Tabla 6. Composición en ácidos grasos del aceite refinado, decolorado y desodorizado obtenido de la soja en el estudio del procesado de 1992, en EEUU¹ (g/100g)

Ácido Graso ²	A5403	40-3-2	Rango en la literatura ³
6:0 (caproico)	0.16	0.20	
7:0 (heptanoico)	0.39	0.46	
16:0 (palmitico)	10.46	10.50	7-12
17:0 (margárico)	0.12	0.14	
18:0 (esteárico)	4.09	4.19	1-5.5,3.9
18:1 cis (oleico)	21.13	21.41	20-50,22.8
18:2 (linoleico)	52.20	51.71	35-60,50.8
18:3 (linolenico)	7.41	7.51	2-13,6.8
19:0 (nonadecanoico)	0.13	<0.10	
20:0 (araquídico)	0.13	0.27	0.2,<1.0
20:1 (eicosanoico)	0.17	0.17	<1.0
22:0 (behénico)	0.55	0.52	<0.5
24:0 (lignocérico)	0.15	0.16	
Desconocidos	2.68	2.47	

¹ Los valores corresponden a una sola muestra. A5403 es la línea de soja control y 40-3-2 la línea de soja Roundup Ready.

² Los ácidos grasos 8:0, 9:0, 10:0, 11:0, 12:0, 13:0, 14:1, 15:0, 16:1, 17:1, 18:1 trans, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:1, 22:2, 22:6 y 24:1 fueron inferiores a <0.1 g/100g en las dos líneas.

³ Pryde, 1990.

Una caracterización detallada de la composición en fosfolípidos de la soja Roundup Ready fue realizada por List y otros. (1999). La lecitina derivada de la soja Roundup Ready fue comparada con muestras de lecitina comercial resultando los niveles de fosfatidilcolina, fosfatidiletalaminina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico encontrados comparables.

La siguiente tabla resume los análisis que se realizaron en semillas de soja y en varias fracciones de soja procesada (Padgett y otros, 1996; Taylor y otros, 1999; List y otros, 1995):

Soja entera	Composición centesimal Composición de aminoácidos Composición de ácidos grasos Inhibidores de la tripsina Lectinas Fitoestrógenos Actividad de la ureasa Composición de fosfolípidos
Harina tostada	Composición centesimal Inhibidores de la tripsina Lectinas Fitoestrógenos Actividad de la ureasa Estaquiosa y rafinosa Fitatos Solubilidad del nitrógeno
Harina desengrasada	Composición centesimal Inhibidores de la tripsina Actividad de la ureasa
Extracto de proteínas	Composición centesimal
Concentrado de proteínas	Composición centesimal
Aceite refinado, decolorado y desodorizado	Composición en ácidos grasos

En todos los casos , los resultados de los análisis demostraron que las semillas de soja y productos alimenticios obtenidos de la soja Roundup Ready línea 40-3-2 son substancialmente equivalentes a los obtenidos de variedades de soja convencionales.

Evaluación nutricional.

Se han realizado una serie de estudios de alimentación animal utilizando dietas que incorporaban soja cruda o procesada procedente de la línea Roundup Ready 40-3-2. Estos estudios confirmaron la equivalencia nutricional de la línea 40-3-2, cuando se utilizaba como alimento para animales, y aborda posibles efectos pleiotrópicos causados por el proceso o el lugar de la inserción .

Los estudios de alimentación animal incluyeron dos estudios separados durante cuatro semanas en ratas, uno de cuatro semanas de vacas lecheras, un estudio de seis semanas en pollos, uno de diez semanas en siluros y uno de cinco días con codornices (Hammond y otros, 1996; Rogers, 1998). Los animales fueron alimentados con soja sin procesar o procesada

(descascarillada, desengrasada y tostada). En estos estudios hubo un grupo control alimentado con una línea de soja parental no modificada (A5403) de la que se obtuvo la línea Roundup Ready 40-3-2. Los resultados de todos los grupos fueron comparados usando métodos estadísticos convencionales con el fin de detectar diferencias entre los distintos grupos en los parámetros medidos.

Los animales (ratas, pollos, siluros y codornices) alimentados con soja Roundup Ready crecieron y tuvieron una ganancia de peso, con relación al pienso ingerido, comparable a la de aquellos alimentados con su homóloga convencional (Hammond y otros, 1996). El estudio realizado en vacas lecheras demostró que la producción y composición de la leche y fermentación en el rumen, fue también comparable en todos los grupos (Hammond y otros, 1996). Los resultados respecto a otros parámetros medidos en cada estudio de alimentación fueron también similares entre grupos. Considerando la población estadounidense como a un todo, y respecto a su consumo de productos derivados de soja, las dosis administradas en los estudios de alimentación animal, (en mg/kg de peso corporal) fueron 100 veces o más superiores al consumo humano diario medio de soja y sus derivados en EEUU (USDA, 1993).

Otro estudio de quince semanas en ratas y ratones comparó el valor alimenticio de la soja Roundup Ready con su control parental (Teshima y otros, 2000). No se observaron diferencias composicionales destacadas entre la soja Roundup Ready y el control no transgénico en cuanto a los ácidos grasos y aminoácidos. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento, valor nutricional y la histopatología de órganos relacionados con el sistema inmune entre los animales alimentados con soja Roundup Ready y los alimentados con el control no transgénico. La producción de inmunoglobulina IgE específica de soja no fue detectada en el suero de ninguno de los grupos de animales y el incremento en IgG específica de soja fue comparable entre ambos grupos. No se observó inmunotoxicidad en ratas o ratones alimentados con soja Roundup Ready.

Todos estos estudios confirman la seguridad para alimentos o piensos y la equivalencia nutricional de dietas preparadas con soja Roundup Ready línea 40-3-2 comparada con dietas preparadas con variedades de soja control. El valor nutritivo de la soja Roundup Ready línea 40-3-2, incluso al

alimentar a los animales con cantidades muy superiores a las que se podrían encontrar en la dieta humana, fue el mismo que el de las variedades de soja convencionales.

EVALUACIÓN MEDIOAMBIENTAL

Soja

La soja cultivada, *Glycine max* (L.) es un tetraploide diploidizado ($2n=40$). Es una planta erecta herbácea, anual, que puede llegar a medir 1,5 metros de altura. El genero *Glycine* es de origen asiático y australiano (Lackey, 1981) y está dividido en dos subgéneros *Glycine* y *Soja*. El primero consta de doce especies silvestres perennes (Hymowitz y otros, 1992) distribuidas principalmente en Australia, Islas del Pacífico Sur, Filipinas, y Taiwán (Newell y Hymowitz, 1978). El subgénero *Soja* consta de tres especies anuales procedentes de Asia, *G. max*, *G. soja* y *G. gracilis*. La primera especie es la soja cultivada, la segunda especie es la forma silvestre de la soja, y la tercera especie se refiere como la forma de soja considerada como maleza (Lackey, 1981). El cultivo de la soja nació en el norte y centro de China y está considerado como uno de los cultivos más antiguos (Hymowitz, 1970). Las evidencias históricas y geográficas sugieren que la soja fue domesticada primero en la mitad oriental de China entre los siglos 17 y 11 A.C. (Hymowitz, 1970). La soja fue introducida por primera vez en los Estados Unidos en 1765, principalmente como planta forrajera (Hymowitz y Harlan, 1983). El éxito del uso de la semilla de la soja para la obtención de aceite en Europa entre 1900 y 1910 promovió el interés en su cultivo en los Estados Unidos.

La soja cultivada es esencialmente autógama, (Carlson y Lersten, 1987; McGregor, 1976). Las anteras maduran en la yema floral y vierten su polen directamente hacia el estigma de la misma flor, asegurando un alto grado de autopolinización. La polinización cruzada generalmente es muy escasa y varios estudios han mostrado que está entre el 0,03 y el 3,62% (McGregor, 1976; Woodworth, 1992). A distancias de más de 4,5 metros de la fuente del polen, la polinización natural cruzada en la soja es poco frecuente (menos del 0.02%) y a menudo indetectable (Caviness, 1966). Caviness (1970) demostró que abejas de la miel son las responsables de la polinización

cruzada ocasional, y que los trips son polinizadores poco eficaces. Como resultado, las plantas de soja son generalmente consideradas como líneas homocigóticas puras de mejora.

La soja cultivada es sexualmente compatible sólo con miembros del género *Glycine*. El cruce de soja con miembros de subgénero *Glycine* sólo es posible con ayuda técnica extrema. La soja no se cruza con ninguna planta emparentada de otros géneros (Hymowitz y Singh, 1987). La soja cultivada es el único miembro del género *Glycine* que crece en los Estados Unidos y sus territorios. Además, esta soja cultivada no es sexualmente compatible con ninguna otra especie de *Glycine* encontrada en los Estados Unidos o sus territorios, a excepción de colecciones especiales para investigación mantenidas bajo examen y cuidado científico.

Las plantas de la soja son anuales y en Estados Unidos no sobreviven vegetativamente de una estación de crecimiento a la siguiente (Hymowitz y Singh, 1987). La supervivencia de una estación a la siguiente es mediante semillas; no obstante, rara vez se ha visto crecimiento espontáneo de la soja cultivada en EEUU. Debido a que la soja no mantiene una alta tasa de germinación y vigor durante largos períodos, en cada estación de cultivo se necesitan semillas frescas, cultivadas y manejadas adecuadamente de las variedades comerciales (TeKrony al et., 1987).

Evaluación de las características agronómicas

La soja Roundup Ready 40-3-2 ha sido probada en ensayos de campo en Estados Unidos, Centroamérica, América del Sur, Europa, Europa Central y Canadá desde 1991. Los datos de más de 150 ensayos de campo realizados en un periodo de más de tres años antes de su comercialización en EEUU, demostraron que la soja Roundup Ready línea 40-3-2 no difiere significativamente de las sojas convencionales en morfología, producción de la semilla (rendimiento), características agronómicas tales como tiempo de floración y cuajado de las vainas o vigor (germinación o persistencia) (Re y otros, 1993). Además, la susceptibilidad a enfermedades e insectos de la soja Roundup Ready 40-3-2 fue monitorizada, sin observarse diferencias en la severidad de enfermedades o infestaciones de insectos entre la soja Roundup Ready y las plantas control (Re y otros., 1993; USDA, 1994).

Recientemente, se han publicado datos relativos al rendimiento y tolerancia al glifosato (Delannay y otros, 1995), resistencia a hongos (Sanogo y otros, 2000) y control de las malas hierbas (Nelson y Renner, 1999). Estos estudios confirman la conclusión de que la tolerancia al glifosato es un carácter hereditario estable y que no se espera que la planta presente riesgos de planta indeseable u otros riesgos para el medio ambiente. Además, la característica Roundup Ready ha sido introducida en variedades de soja convencionales de la mayoría de los proveedores de semillas de soja y esto ha llevado al desarrollo de más de mil variedades de soja Roundup Ready en América del Norte. Las variedades de soja Roundup Ready han sido cultivadas comercialmente en más de 40 millones de hectáreas a nivel mundial entre 1996 y 2000. Al introducir esta mejora no se ha detectado ninguna característica indeseable de las plantas y tampoco se ha observado ningún efecto negativo en el medioambiente, lo cual ha sido confirmado a través de amplios estudios tanto antes como después de su aprobación e introducción en el mercado. El comportamiento agronómico y la tolerancia al glifosato han sido uniformes y consistentes en estas variedades, tal como se esperaba.

Evaluación del potencial como mala hierba

La introducción de los genes de tolerancia a un herbicida en un cultivo no debe incrementar su potencial como mala hierba. Baker (1965) desarrolló un consenso general respecto a los rasgos comunes de muchas malas hierbas y la soja posee pocas características de las plantas que son consideradas malas hierbas. La soja es un cultivo anual considerado muy domesticado, con una planta bien caracterizada, que no persiste en ambientes inalterados sin la intervención humana. La variedad A5403, variedad parental de la soja Roundup Ready 40-3-2, no se considera como una mala hierba y la introducción del factor de tolerancia al glifosato en este cultivo no le ha conferido nuevas características para considerarla como mala hierba. No se apreciaron diferencias entre las variedades transformada y sin transformar, respecto al número de semillas producido, las características de germinación de las semillas, la densidad final del cultivo, y la susceptibilidad a insectos o enfermedades (USDA, 1994). Puesto que tanto las plantas de soja Roundup Ready como las convencionales pueden ser controladas eficazmente con herbicidas diferentes al glifosato o mediante labores, la característica Roundup Ready no ofrece una ventaja selectiva en ausencia de este herbicida.

Evaluación de los efectos en organismos no objetivo

La soja Roundup Ready, línea 40-3-2 codifica la enzima CP4 EPSPS. La EPSPS es una enzima necesaria en la ruta del sikimato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas y microorganismos (Levin y Springson, 1964), y está normalmente presente en alimentos y piensos de origen vegetal. Las proteínas EPSPS de varias bacterias muestran tolerancia al glifosato (Schulz y otros, 1985). Así, la proteína CP4 EPSPS es una de las muchas proteínas EPSPS presentes en la naturaleza. Por ello, todos los organismos que se alimenten de vegetales en algún momento de su vida han sido expuestos a la ingestión de proteínas EPSPS.

Teniendo en cuenta que las aves se pueden alimentar de las semillas de soja que quedan en el campo, después de la cosecha, se evaluó la salubridad de la soja Roundup Ready en la codorniz Bobwhite que es la tradicionalmente usada en estudios sobre alimentación de aves. No se encontraron diferencias en el consumo del alimento, aumento de peso corporal o conducta, entre las aves alimentadas con 200.000 ppm (20% peso/peso) de torta cruda de soja Roundup Ready y las aves alimentadas con torta cruda de soja de la variedad parental A5403. Con base en los parámetros medidos, la salubridad de la soja Roundup Ready se consideró equivalente a la de la línea patrón no transgénica en cuanto a su uso para la alimentación de codornices.

Impacto potencial en la biodiversidad

Dado que las proteínas EPSPS se encuentran de forma natural entre plantas y hongos de la naturaleza, que no son tóxicas para peces, aves, insectos, mamíferos y otras especies y que la exposición a estas especies es bastante improbable, debido a sus preferencias alimentarias, no se espera que se produzca ningún efecto adverso sobre la fauna salvaje tras la comercialización de la soja Roundup Ready. Además, los datos agrónomicos y de composición obtenidos de la soja Roundup Ready apoyan la afirmación de que el impacto sobre la biodiversidad de la soja modificada será equivalente al de la soja tradicional.

Evaluación de la tolerancia al glifosato

Hasta el momento se han identificado más de 100 malas hierbas que han desarrollado resistencia a herbicidas; más de la mitad de ellas son

resistentes a herbicidas de la familia de las triazinas (Holt y Le Baron, 1990; Shaner, 1995). La resistencia se ha desarrollado normalmente a causa de la presión selectiva producida por el repetido uso de herbicidas con un único mecanismo de acción, por una larga actividad residual del herbicida con capacidad de controlar malas hierbas durante un año, y por las frecuentes aplicaciones del mismo herbicida sin rotación con otros herbicidas o prácticas culturales. Usando estos criterios y en base a datos actuales, el glifosato se considera un herbicida con un riesgo bajo de desarrollo de resistencia en malas hierbas (Benbrook, 1991). No obstante, la cuestión se centra en si la introducción de cosechas tolerantes a un herbicida específico, como glifosato, puede llevar a la aparición de malas hierbas resistentes a ese herbicida en particular. Esta preocupación se basa en que el uso del herbicida se incrementará significativamente, y que posiblemente este se usará repetidamente en la misma localidad. Sin embargo, el aumento en el uso del glifosato en los años previos había sido mayor que el asociado con la introducción de las variedades de soja Roundup Ready. Aunque no se puede afirmar que la aparición de resistencia al glifosato no ocurra, el desarrollo de la resistencia al glifosato en las malas hierbas se espera que sea un suceso raro ya que:

- 1) las hierbas y los cultivos no ofrecen tolerancia natural a este herbicida, y en la larga historia de uso extensivo de glifosato se han dado pocos casos de malas hierbas resistentes (Bradshaw y otros, 1997);
- 2) el glifosato tiene muchas propiedades únicas, tales como su modo de acción, estructura química, metabolismo limitado en plantas, y ausencia de actividad residual en el suelo, lo que hace que el desarrollo de resistencias sea poco probable;
- 3) la generación de resistencia al glifosato usando plantas enteras o técnicas de cultivo de tejidos no ha sido posible, por lo que es extraño que ocurra en la naturaleza en condiciones normales de campo.

En 1996, en Australia, se informó que un biotipo de vallico (*Lolium rigidum*) estaba sobreviviendo a las aplicaciones recomendadas de glifosato (Pratley y otros, 1996). Hasta el momento, después del examen de miles de muestras, se ha confirmado que sólo en tres lugares había poblaciones resistentes, indicando que el fenómeno no se había extendido. Un gran

número de experimentos bioquímicos y de biología molecular para determinar la causa de las diferencias de control de las malas hierbas entre el biotipo resistente de vallico de Australia y el sensible al glifosato, indicaron que la resistencia observada era debida a una combinación de factores. Las conclusiones hasta el día de hoy son que el biotipo resistente es fácilmente controlado por prácticas convencionales (cultivo, otros herbicidas), y que está causado por un complejo patrón de herencia, que hace improbable que esto ocurra en una amplia gama de otras especies (Pratley, 1999).

En la actualidad, están siendo investigados dos informes adicionales de vallico resistente en el norte de California. Al igual que en las localidades australianas, estos campos son pequeños y aislados. De nuevo, el uso de la siega y otros herbicidas han sido muy efectivo en el control del vallico, y continúa la investigación para entender mejor el mecanismo de resistencia. Más recientemente, se ha informado que una población de *Elusine indica* ("goosegrass") sobrevivió a las dosis recomendadas de glifosato en cultivos de Malasia; los análisis indicaron que la *Eleusine* resistente tiene una proteína EPSPS modificada que es de dos a cuatro veces menos sensible al glifosato que otros biotipos más sensibles. Las investigaciones continúan, en un esfuerzo por mejorar la comprensión del mecanismo de resistencia.

Conclusiones de la evaluación medioambiental

En resumen, las evidencias recogidas hasta el día de hoy, muestran que la soja Roundup Ready ofrece a los agricultores nuevas oportunidades para obtener cosechas de soja de una forma que es medioambientalmente superior a los métodos tradicionales. Las evaluaciones agronómicas consistentes en el vigor de la planta, características de los hábitos de crecimiento y susceptibilidad a las enfermedades, han mostrado que la soja Roundup Ready no representa un problema como planta agresiva en comparación con la variedad de soja parental A5403. Es más, la proteína CP4 EPSPS introducida no aporta ninguna toxicidad potencial para la fauna y los organismos a los que no va dirigido. Además, los datos generados que apoyan el registro del herbicida Roundup y casi 30 años de experiencia, de uso comercial con el glifosato, demuestran que este herbicida es esencialmente no-tóxico para los humanos, mamíferos y otros organismos, y no se espera que su uso en la soja cause efectos adversos o inaceptables para el medio ambiente.

CONCLUSIONES

La introducción de las variedades de soja Roundup Ready ha reducido el número y coste de aplicaciones de herbicidas, y ofrece considerables beneficios medioambientales gracias a que facilita la agricultura de conservación. Detalladas evaluaciones sobre seguridad alimentaria y medioambiental confirman la seguridad de este producto con base en: la seguridad de los elementos genéticos contenidos en el vector de transformación usado en la producción de la soja Roundup Ready línea 40-3-2; la función metabólica conocida y el historial de uso seguro (incluyendo el consumo) de la familia de proteínas EPSPS presente en todas las plantas, hongos y bacterias; la evaluación directa de la proteína CP4 EPSPS (incluyendo ausencia de toxicidad); la evaluación de la equivalencia de composición y nutricional de la línea 40-3-2 (comparando nutrientes importantes, antinutrientes y alérgenos de la variedad parental y de la soja convencional); una comparación de las características agronómicas de la variedad 40-3-2 con la soja parental convencional; y una comparación de las propiedades nutricionales y de seguridad de la línea 40-3-2 con la soja parental y variedades de soja convencionales, mediante estudios de alimentación animal.

Estas evaluaciones confirman que la soja Roundup Ready es tan segura como las variedades de soja convencionales y que la soja Roundup Ready no presenta riesgos de planta indeseable o de otro tipo para el medio ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION. 1999. 1999 Soy Stats Reference Guide. American Soybean Association, St. Louis, MO.
- ANDERSON, K.S., AND K.A. JOHNSON. 1990. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: Lessons from EPSP synthase. Chem. Rev. 90:1131-1149.
- ASTWOOD, J.D. AND R.L. FUCHS. 2000. Status and safety of biotech crops. Pp. 152-164. In *Agrochemical Discovery-Insect, Weed and Fungal Control*. Baker, D.R. and N.K. Umetsu (eds.). ACS Symposium Series 774. American Chemical Society, Washington, D.C.
- ASTWOOD, J.D. AND FUCHS, R.L. 1996. Food allergens are stable to digestion in a simple model of the human gastrointestinal tract. Journal of Allergy and Clinical Immunology 97:241.
- ASTWOOD, J.D., J.N. LEACH AND R.L. FUCHS. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nature Biotechnology 14:1269-1273.
- BAKER, H. G. 1965. Characteristics and Modes of Origin of Weeds. In *The Genetics of Colonizing Species*. Pp. 147-172. Baker, H. G., Stebbins, G. L. (eds.). Academic Press, New York and London.
- BAKER, J.L. AND J.M. LAFLEN. 1979. Runoff losses of surface-applied herbicides as affected by wheel tracks and incorporation. Journal of Environmental Quality 8:602-607.
- BENBROOK, C. 1991. Racing against the clock. Pesticide-resistant biotypes gain ground. Agrichemical Age. Pp. 30-33.
- BOOKWALTER, G.N. 1978. Soy protein utilization in food systems. In *Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins*. Friedman, M. (ed.). Pp. 749-766. Plenum Press, New York, NY.
- BRADSHAW, L.D., S.R. PADGETTE, S.L. KIMBALL, AND B.H. WELLS. 1997. Perspectives on glyphosate resistance. Weed Technol. 11:189-198.
- BURKS, A.W. AND R.L. FUCHS. 1995. Assessment of the endogenous allergens in glyphosate-tolerant and commercial soybean varieties. J. Allergy Clin. Immunology 96:1008-1010.
- BUSH, R.K., S.L. TAYLOR, J.A. NORDLEE, AND W.W. BUSSES. 1985. Soybean oil is not allergenic to soybean-sensitive individuals. J. Allergy Clin. Immunol. 76:242-245.
- CARLSON, J. B. AND N.R. LERSTEN. 1987. Reproductive morphology. In *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*, Second edition. Pp. 95-134. Wilcox, J. R. (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- CARPENTER, J. E. 2001. Case studies in benefits and risks of agricultural biotechnology: Roundup Ready soybeans and Bt field corn. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington, DC.
- CAVINESS, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. Crop Science 15:84-86.
- CAVINESS, C. E. 1970. Cross-pollination in the soybean. In *The Indispensable Pollinators*. Pp. 33-36. University of Arkansas Extension Service Publication, Fayetteville, Arkansas.

- CHRISTOU, P., D.E. MCCABE, AND W.F. SWAIN. 1988. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* 87:671-674.
- CTIC. 1998. Crop Residue Management Survey. Conservation Technology Information Center. West Lafayette, Indiana.
- CTIC. 2000. Top Ten Benefits. Conservation Technology Information Center. West Lafayette, Indiana.
- CULPEPPER, A.S. AND A.C. YORK. 1998. Weed management in glyphosate-tolerant cotton. *J. Cotton Sci.* 2:174-185.
- DELANNAY, X., T.T. BAUMAN, D.H. BEIGHLEY, M.J. BUETTNER, H.D. COBLE, M.S. DEFELICE, C.W. DERTING, T.J. DIEDRICK, J.L. GRIFFIN, E.S. HAGOOD, F.G. HANCOCK, S.E. HART, B.J. LAVALLEE, M.M. LOUX, W.E. LUESCHEN, K.W. MATSON, C.K. MOOTS, E. MURDOCK, A.D. NICKELL, M.D.K. OWEN, E.H. PASCHAL, L.K. PROCHASKA, P.J. RAYMOND, D.B. REYNOLDS, W.K. RHODES, F.W. ROETH, P.L. SPRANKLE, L.J. TAROCHIONE, C.N. TINIUS, R.H. WALKER, L.M. WAX, H.D. WEIGELT, AND S.R. PADGETTE. 1995. Yield evaluation of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line after Treatment with Glyphosate. *Crop Science* 35:1461-1467.
- DOOLITTLE, R.F. 1990. Searching through Sequence Databases. In *Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences*. Doolittle, R. F. (ed.). Pp. 999-1110. Academic Press, San Diego, CA.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 1996. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies, Rome, Italy, November 13-14, 1995. FAO, Rome.
- FDA. 1992. Statement of policy: foods derived from new plant varieties. Federal Register 57:22984-23005.
- FRANZ, J.E., M.K. MAO, AND J.A. SIKORSKI. 1997. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. ACS Monograph 189. Pp. 8-9. American Chemical Society, Washington D.C.
- FUCHS, R.L. AND J.D. ASTWOOD. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technology* 50: 83-88.
- FULMER, R.W. 1988. The soybean as a chemical factory. In *Soybean Utilization Alternatives*. McCann, L. (ed.). Pp. 1-12. Center for Alternative Crops and Products, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- GIESY, J.P., S. DOBSON AND K.R. SOLOMON. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167:35-120.
- HAMMOND, B.G., J.L. VICINI, G.F. HARTNELL, M.W. NAYLOR, C.D. KNIGHT, E.H. ROBINSON, R.L. FUCHS, AND S.R. PADGETTE. 1996. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *J. Nutrition* 126:717-727.
- HARLOW E., AND D. LANE. 1988. Immunoassay. In *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14: 553-612. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- HARRISON, L.A., M.R. BAILEY, M.W. NAYLOR, J.E. REAM, B.G. HAMMOND, D.L. NIDA, B.L. BURNETTE, T.E. NICKSON, T.A. MITSKY, M.L. TAYLOR, R.L. FUCHS AND S.R. PADGETTE. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from agrobacterium sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutrition* 126:728-740.

- HEBBLETHWAITE, J.F. 1995. The Contribution of No-Till to Sustainable and Environmentally Beneficial Crop Production: A Global Perspective. Conservation Technology Information Center. West Lafayette, Indiana.
- HOLT, J.S. AND H.M. LeBARON. 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. Weed Tech. 4:141-149.
- HORAN, F.E. 1974. Soy protein products and their production. J. Am. Oil Chem. Soc. 51:67A-73A.
- HYMOWITZ, T. 1970. On the domestication of the soybean. Econ. Bot. 24:408-421.
- HYMOWITZ T., AND J.R. HARLAN. 1983. Introduction of soybean to North America by Samuel Bowen in 1765. Econ. Botany 37(4):371-379.
- HYMOWITZ, T., SINGH, R. J. 1987. Taxonomy and speciation. In Soybeans: Improvement, Production, and Uses, Second edition. Pp. 23-48. Wilcox, J. R. (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- HYMOWITZ, T., R.G. PALMER, R. G., AND R.J. SINGH. 1992. Cytogenetics of the genus Glycine. In Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part B, Pp. 53-63. Tsuchiya, T., Gupta, P. K. (eds.). Elsevier Scientific Publication, B.V. Amsterdam.
- JAMES, C. 2000. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2000. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). ISAAA Briefs No. 21: Preview. ISAAA, Ithaca, NY.
- KAY, B.D. 1995. Soil quality: impact of tillage on the structure of tilth of soil. In Farming for a Better Environment. Pp 7-9. Soil and Water Conservation Society. Ankeny, Iowa.
- KEELING, J.W., P.A. DOTRAY, T.S. OSBORN, AND B.S. ASHER. 1998. Postemergence weed management with Roundup Ultra, Buctril and Staple in Texas High Plains cotton. In Proceedings of the Beltwide Cotton Conference 1:861-862. National Cotton Council, Memphis, Tennessee.
- KERN, J.S. AND M.G. JOHNSON. 1993. Conservation tillage impacts on national soil and atmospheric carbon levels. Soil Science Society of America Journal 57:200-210.
- KIMBER, I., N.I. KERKVLIT, S.L. TAYLOR, J.D. ASTWOOD, K. SARLO, AND R.J. DEARMAN. 1999. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. Toxicological Sciences, 48:157-162.
- LACKEY, J.A. 1981. Phaseoleae. In Advances in legume systematics. Pp. 301-327. Polhill, R. M. and Raven, P.H. (eds). Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- LEVIN, J.G. AND D.B. SPRINSON. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvyl shikimate 5-phosphate. J. Biol. Chem. 239:1142-1150.
- LIST, G.R., F. ORTHOEFER, N. TAYLOR, T. NELSEN, AND S.L. ABIDI. 1999. Characterization of phospholipids from glyphosate-tolerant soybeans. Journal of the American Oil Chemists Society 76:57-60.
- MATTIL, K.F. 1974. Composition, nutritional, and functional properties, and quality criteria of soy protein concentrates and soy protein isolates. Journal of the American Oil Chemists Society 51:81A-84A.

- MCCABE, D.E., W.F. SWAIN, B.J. MARTINELL, AND P. CHRISTOU. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- MCGREGOR, S. E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. P.411. *Agriculture Handbook No. 496*. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- METCALFE, D.D., J.D. ASTWOOD, R. TOWNSEND, H.A. SAMPSON, S.L. TAYLOR, AND R.L. FUCHS. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(S):S165-S186.
- MOUNTS, T.L., W.J. WOLF AND W.H. MARTINEZ. 1987. Processing and utilization. *In Soybeans: Improvement, Production and Uses*. Wilcox, J.R. (ed.). 2nd ed. Pp. 819-866. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI.
- NELSON, K.A. AND K.A. RENNER. 1999. Weed management in wide- and narrow-row glyphosate-resistant soybean. *Journal of Production Agriculture* 12:460-465.
- NEWELL, C.A. AND T. HYMOWITZ. 1978. A reappraisal of the subgenus *Glycine*. *American Journal of Botany* 65:168-179.
- O'DELL, B.L. 1979. Effect of soy protein on trace mineral availability. *In Soy Protein and Human Nutrition*. Wilcke, H.L., Hopkins, D.T. and Waggle, D.H. (eds.). Pp. 187-204. Academic Press, New York, NY.
- ORTHOEFER, F.T. 1978. Processing and utilization. *In Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization*. Norman, A.G. (ed.). Pp. 219-246. Academic Press, New York, NY.
- PADGETTE, S.R., C.E. SMITH, Q. KHAIHUYNH, AND G.M. KISHORE. 1988. Arginine chemical modification of petunia hybrida 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 266:254-262.
- PADGETTE, S.R., D.B. RE, C.S. GASSER, D.A. EICHHOLTZ, R.B. FRAZIER, C.M. HIRONAKA, E.B. LEVINE, D.M. SHAH, R.T. FRALEY, AND G.M. KISHORE. 1991. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. *Journal of Biological Chemistry* 266:22364-22369.
- PADGETTE, S.R., D.B. RE, B.G. HAMMOND, R.L. FUCHS, S.G. ROGERS, L.A. HARRISON, D.L. NIDA, M.W. NAYLOR, K.H. KOLACZ, N.B. TAYLOR, AND J.E. REAM. 1994. Safety, compositional and nutritional aspects of glyphosate-tolerant soybeans: conclusion based on studies and information evaluated according to FDA's consultation process. Pp. 1-107. Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- PADGETTE, S.R., K.H. KOLACZ, X. DELANNAY, D.B. RE, B.J. LAVALEE, C.N. TINIUS, W.K. RHODES, Y.I. OTERO, G.F. BARRY, D.A. EICHHOLTZ, V.M. PESCHKE, D.L. NIDA, N.B. TAYLOR, AND G.M. KISHORE. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* 35:1451-1461.
- PADGETTE, S.R., D.B. RE, G.F. BARRY, D.A. EICHHOLTZ, X. DELANNAY, R.L. FUCHS, G.M. KISHORE, AND R.T. FRALEY. 1996a. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. Pp. 53-84. *In Herbicide-Resistant Crops*. Duke, S.O. (ed.) Agricultural, Economic, Regulatory and Technical Aspects. CRC Lewis Publishers.

- PADGETTE, S.R., N.B. TAYLOR, D.L. NIDA, M.R. BAILEY, J. MACDONALD, L.R. HOLDEN, AND R.L. FUCHS. 1996b. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. Journal of Nutrition 126:702-716.
- PERKINS, E.G. 1995. Composition of soybeans and soybean products. In *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*. Erickson, D.R. (ed.). Pp. 9-28. AOCs Press and United Soybean Board, Champaign, IL and St. Louis, MO.
- PETTERSSON, H. AND K.H. KIESSLING. 1984. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67:503-506.
- PRATLEY, J., B. BAINES, P. EBERBACH, M. INCERTI, AND J. BROSTER. 1996. Glyphosate resistance in annual ryegrass. Proceedings of the Eleventh Annual Conference, Grasslands Society of New South Wales.
- PRATLEY, J.B. 1999. Weed Science Society of America meeting. February, 1999.
- PRYDE, E.H. 1990. Composition of soybean oil. In *Handbook of Soy Oil Processing and Utilization*. Erickson, D.R., Pryde, E.H., Brekke, O.L., Mounts, T.L. and Falb, R.A. (eds.). 5th ed. Pp. 13-31. American Soybean Association and American Oil Chemists' Society, St. Louis, MO and Champaign, IL.
- RACKIS, J.J. 1974. Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chem. Soc. 51:161A-173A.
- RE, D.B., S.R. PADGETTE, X. DELANNAY, K. KOLACZ, D.L. NIDA, V.M. PESCHKE, C.W. DERTING, S.G. ROGERS, J.W. EDWARDS, G.F. BARRY, AND N.A. BIEST. 1993. Petition for Determination of Nonregulated Status: Soybeans with a Roundup Ready Gene. Submitted to USDA-APHIS by Monsanto Company, St. Louis, Missouri.
- REICOSKY, D.C. 1995. Impact of tillage on soil as a carbon sink. In *Farming for a Better Environment*. Soil and Water Conservation Society. Ankeny, Iowa.
- REICOSKY, D.C., AND M.J. LINDSTROM. 1995. Impact of fall tillage on short-term carbon dioxide flux. Pp 177-187. In *Soils and Global Change*. Lal, R., J. Kimble, E. Levine, and B.A. Stewart (eds.). Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.
- ROBERTS, R.K., R. PENDERGRASS, AND R.M. HAYES. 1999. Economic analysis of alternative herbicide regimes on Roundup Ready soybeans. J. Production Agriculture 12:449-454.
- ROGAN, G.J., Y.A. DUDIN, T.C. LEE, K.M. MAGIN, J.D. ASTWOOD, N.S. BHAKTA, J.N. LEACH, P.R. SANDERS, AND R.L. FUCHS. 1999. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans. Food Control 10: 407-414.
- ROGERS, S.G. 1998. Am. J. Clin. Nutr. 68(6, Suppl.), 1330S-1332S.
- SANOGO, S., X.B. YANG, AND H. SCHERM. (2000) Effects of Herbicides on *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean. Phytopathology 90:57-66.
- SCHULZ, A., A. KRUPER AND N. AMHEIN. 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. FEMS Microbiol. Lett. 28:297-301.
- SHANER, D.L. 1995. Herbicide resistance: Where are we? How did we get here? Where are we going? Weed Technol. 9:850-856.

- SIPOS, E.F. 1988. Edible uses of soybean protein. *In Soybean Utilization Alternatives*. McCann, L. (ed.). Pp. 57-93. Center for Alternative Crops and Products, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- SJOBAD, R. D., J.T. MCCLINTOCK AND R. ENGLER. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. Regulatory Toxicol. and Pharmacol. 15:3-9.
- SLEISENGER, M.H. AND J.S. FORDTRAN. 1989. Gastrointestinal disease. *In Pathophysiology Diagnosis Management*, Fourth Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
- SMITH, A.K. AND S.J. CIRCLE. 1972. Chemical composition of the seed. *In Soybeans: Chemistry and Technology*, Volume 1, Proteins. Smith, A.K., Circle, S.J. (eds.) Pp. 61-92. Avi Publishing, Westport, CT.
- STALLINGS, W.C., S.S. ABDEL-MEGUID, L.W. LIM, H. SHIEH, H.E. DAYRINGER, N.K. LEIMGRUBER, R.A. STEGEMAN, K.S. ANDERSON, J.A. SIKORSKI, S.R. PADGETTE AND G.M. KISHORE. 1991. Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5046-5050.
- STEINRUCKEN, H.C. AND N. AMRHEIN, 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 94:1207-1212.
- TAYLOR, S.L., R.F. LEMANSKE JR., R.K. BUSH, AND W.W. BUSSE. 1987. Food allergens: structure and immunologic properties. Ann. Allergy 59:92-99.
- TAYLOR, S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. Food Technology 46: 146-152.
- TAYLOR, N.B., R.L. FUCHS, J. MACDONALD, A.R. SHARIF, AND S.R. PADGETTE. 1999. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:4469-4473.
- TEKRONY, D. M., D.B. EGLI, AND G.M. WHITE. 1987. Seed production and technology. *In Soybeans: Improvement, Production, and Uses*, Second Edition. Pp. 295-354. Wilcox, J. R. (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- TESHIMA, R., H. AKIYAMA, H. OKUNUKI, J. SAKUSHIMA, Y. GODA, H. ONODERA, J. SAWADA AND M. TOYODA. 2000. Effect of GM and non-GM soybeans on the immune system of BN rats and B10A mice. J. Food Hyg. Soc. Japan. -41:188-193.
- TORUN, B. 1979. Nutritional quality of soybean protein isolates: studies in children of preschool age. *In Soy Protein and Human Nutrition*. Wilke, H.L., Hopkins, D.T. and Waggle, D.H. (eds.). Pp. 101-119. Academic Press, New York, NY.
- USDA (1991 - 2000) National Agricultural Statistics Service, Agricultural Chemical Usage: Field Crops Summary.
- USDA. 1993. United States Department of Agriculture Continuing Surveys of Food Intake by Individuals (CSFII) 1989-1992.
- USDA. 1994. Petition 93-258-01 for determination of nonregulated status for glyphosate tolerant soybean line 40-3-2: Environmental assessment and finding of no significant impact. Federal Register 59:26781-26782.

- U.S. EPA. 1993. Reregistration Eligibility Decision (RED): Glyphosate. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. 1989. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md., Volume XXII pp. 1788-1789.
- WAGGLE, D.H. AND C.W. KOLAR. 1979. Types of soy protein products. *In Soy Protein and Human Nutrition*. Wilke, H.L., Hopkins, D.T. and Waggle, D.H. (eds.). Pp. 19-51. Academic Press, New York, NY.
- WANG, G., S.S. KUAN, O.J. FRANCIS, G.M. WARE AND A.S. CARMAN. 1990. J. Agric. Food Chem. 38:185-190.
- WHO. 1994. Glyphosate. World Health Organization (WHO), International Programme of Chemical Safety (IPCS), Geneva. Environmental Health Criteria No. 159.
- WILCOX, J.R. 1985. Breeding soybeans for improved oil quantity and quality. *In World Soybean Research Conference III: Proceedings*. Shible, R. (ed.). Pp. 380-386. Westview Press, Boulder, CO.
- WILLIAMS, G. M., R. KROES, AND I.C. MUNRO. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, Glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31:117-165.
- WOLF, W.J. 1983. Edible soybean protein products. *In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture*. Vol. II. Part 2. Wolff, I.A. (ed.). Pp. 23-55. CRC Press, Boca Raton, FL.
- WOODWORTH, C. M. 1992. The extent of natural cross-pollination in soybeans. Journal of the American Society of Agronomy 14:278-283.



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