

Evaluation des risques du coton Bt

Chaque introduction d'une nouvelle technologie fait naître des questions et soulève des risques qu'il faut évaluer. Pour le coton Bt Bollgard[®], les principales questions concernaient deux domaines – les risques potentiels pour l'environnement et la possibilité que des insectes développent des résistances. Une évaluation des risques concernant la sécurité alimentaire humaine et animale a aussi été réalisée parce que l'huile de graine de coton est utilisée dans l'alimentation humaine et que la farine de graine de coton est utilisée pour nourrir le bétail.

1 Evaluation des risques environnementaux

1.1 Performances agronomiques

Avant l'introduction du coton Bt Bollgard[®] aux USA en 1996, des observations agronomiques détaillées ont été réalisées lors d'essais en champs de grande superficie pendant plusieurs années. Les observations agronomiques portant sur la sensibilité aux parasites et aux maladies ont confirmé que, à l'exception de la résistance aux lépidoptères nuisibles, le coton Bt se trouve agronomiquement parlant dans la gamme normale de variabilité des variétés commerciales de coton (Hamilton et al 2002). De plus, le coton Bollgard[®] est cultivé commercialement aux USA, en Australie, au Mexique, en Afrique du Sud, Chine, Argentine, Colombie, Indonésie et Inde depuis sa première introduction aux USA. Aucune caractéristiques défavorables inhabituelles de la plante ou effets environnementaux imprévus imputables au segment d'ADN inséré ou aux protéines exprimées n'ont été observés ainsi que cela a été confirmé par les études à grande échelle effectuées avant et après son autorisation et son introduction sur le marché. Les performances agronomiques du coton Bollgard[®] et la protection contre les dommages aux insectes nuisibles de la famille des lépidoptères ont été conformes aux prévisions (Edge et al 2001, Benedict and Altman 2001, Gianessi and Carpenter 1999).

1.2 L'organisme donneur

La sécurité de l'organisme donneur des gènes *Cry1Ac* et *nptII* contenus dans le coton Bollgard[®] est bien établie. Le gène *Cry1Ac* code pour une protéine insecticide dérivée de la bactérie du sol très répandue *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.). L'histoire de l'utilisation de la protéine Cry1Ac dans des produits microbiens à base Bt ne montre pas de risques (USEPA 1988, IPCS 2000). Des formules microbiennes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) contenant la protéine insecticide ont été enregistrées dans de nombreux pays dans le monde entier. Elles ont été utilisées avec sécurité pour contrôler les insectes nuisibles de la famille des Lépidoptères depuis plus de 40 ans (Betz et al 2000). La séquence en acides aminés de la protéine Cry1Ac produite dans le coton Bollgard[®] est identique à 99,4% à celle prédictée. L'activité biologique de la protéine Cry1Ac produite dans le coton Bollgard[®] est comparable à celle de la protéine produite dans la nature et dans les formules microbiennes Bt commerciales (Hamilton et al 2002). Il a été montré que *Bacillus thuringiensis* et les formules microbiennes Bt sont très spécifiques de l'insecte cible nuisible et n'ont pas d'effets néfastes sur les organismes non-cibles comme les insectes utiles (autres que les Lépidoptères apparentés proches), oiseaux, poissons et mammifères y compris les humains (USEPA 1988, Betz et al 2000). La protéine NPTII exprimée dans le coton Bollgard[®] est chimiquement et fonctionnellement similaire à celle produite naturellement. La

protéine NPTII (le donneur est *E. coli*) est omniprésente dans l'environnement et se trouve dans les microbes présents dans l'alimentation humaine et dans le système digestif humain (Fuchs et al 1993, USFDA 1994).

1.3 Effet sur les organismes non-cibles

L'abondante information concernant les préparations microbiennes de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k) qui contiennent la protéine Cry, y compris la protéine Cry1Ac, démontre que ces protéines ne sont pas toxiques pour les organismes non-cibles (USEPA 1988, Betz et al 2000). La littérature a établi que la protéine Cry1Ac a une action spécifique sur les insectes de la famille des Lépidoptères. Elle s'accroche de façon spécifique dans l'intestin des Lépidoptères et n'a pas d'effets néfastes sur les insectes utiles ou non-cibles. L'innocuité de la protéine Cry1Ac exprimée dans le coton Bollgard[®] pour les organismes non-cibles a été confirmée pour plusieurs organismes représentatifs (Hamilton et al 2002). L'utilisation de la technologie Bt chez les plantes ne nuit pas aux insectes utiles, non-cibles, comme c'est le cas lors de l'utilisation de pulvérisations d'insecticides à large spectre (Benedict and Altman 2001). La protéine Bt affecte un ensemble spécifique de nuisibles ciblés. Les nuisibles non-cibles non apparentés ne sont pas affectés.

Toutefois, il a été démontré que les pyréthoïdes affectent un grand nombre d'espèces non-cibles (Badawy and El-Arnaouty 1999). Aussi, depuis l'utilisation du coton Bollgard[®] qui a entraîné une réduction des applications d'insecticides synthétiques conventionnels (Gianessi and Carpenter, 1999), une augmentation des populations d'insectes utiles dans les champs de coton Bollgard[®] est attendue. Plusieurs études ont montré que les organismes prédateurs non-cibles peuvent être plus actifs dans les cotons Bollgard[®] comme agents de contrôle biologique pour des nuisibles secondaires (Edge et al 2001). Des surveillances après la commercialisation indiquent que les populations de prédateurs, d'organismes non-cibles sont significativement plus nombreuses dans les champs de coton Bt que dans les champs de coton traditionnel qui ont été traités avec des insecticides (Head et al In Press a, Head et al 2001, Roof and Durant 1977) et qu'elles procurent un contrôle biologique des nuisibles secondaires. Des études rapportent que les quantités de nuisibles secondaires comme *Spodoptera* sont plus faibles dans les champs de coton Bt parallèlement au grand nombre d'insectes prédateurs présents (Smith 1977).

1.4 Le coton Bt peut-il devenir une mauvaise herbe.

L'espèce *Gossypium hirsutum* est bien caractérisée et elle a un historique de production dans un large éventail d'environnements agricoles qui ne montre pas de problèmes. Dans le passé,

l'amélioration végétale intensive ayant pour but de développer un gémplasma adapté à la forte productivité dans des conditions agricoles qui rendent peu probable le fait que le coton puisse effectivement concurrencer d'autres espèces et survivre dans l'environnement comme une mauvaise herbe. Le coton ne se trouve pas comme une plante adventice dans l'aire globale de production de coton. Le coton Bollgard® n'a pas de plus de caractéristiques de plantes adventices que les autres variétés traditionnelles de coton (Hamilton et al 2002). Bollgard® ne montre pas de caractères agronomiques ou morphologiques différents par rapport aux contrôles, qui lui confèreraient un avantage compétitif sur les autres espèces présentes dans l'écosystème dans lequel il est cultivé. Aussi, la probabilité qu'une autre espèce de *Gossypium* se croisant avec le coton Bollgard® puisse augmenter ses caractéristiques de mauvaise herbe est faible. Ainsi, il n'y a pas de preuves que l'insertion de la séquence codant pour la protéine Cry1Ac dans le génome du coton ait un effet quelconque sur le potentiel de mauvaise herbe de la plante de coton.

1.5 Conséquences environnementales du transfert de pollen

Le coton est une plante cultivée essentiellement autogame mais des allofécondations dues à certains insectes peuvent se produire (Niles and Feaster 1993). Toutefois, le transfert de la séquence codant pour la protéine *Cry1Ac* du coton Bollgard® vers d'autres espèces de *Gossypium* ou d'autres espèces de la famille des malvacées est fort peu probable pour les raisons suivantes (Percival et al 1999):

- Le coton cultivé est un allotétraploïde qui est incompatible avec les espèces de coton cultivé ou les espèces sauvages diploïdes. Ainsi, il ne peut se croiser et produire une descendance fertile.
- Bien que la fécondation croisée avec des plantes sauvages ou subsponsantées allotétraploïdes puisse se produire, elle est virtuellement impossible car la zone de production commerciale de coton et la distribution géographique des espèces apparentées sont différentes. Par exemple, *G. tomentosum*, une espèce de Hawaii pourrait se croiser avec le coton cultivé si celui-ci était cultivé sur l'île.
- Il n'y a pas d'espèces pouvant se croiser avec le coton cultivé n'appartenant pas à la famille du coton.

Le fait que des plants de coton qui s'échapperaient de l'agrosystème n'est pas un enjeu important car elles sont contrôlées par de nombreux herbicides enregistrés. Ainsi les conséquences environnementales du transfert de pollen sont négligeables à cause du mouvement limité, des barrières génétiques naturelles qui empêchent les fécondations croisées avec le coton indigène et l'absence de compatibilité avec des espèces sauvages apparentées. La sécurité de la protéine Cry1Ac est bien documentée et le gène *Cry1Ac* ne pourrait pas conférer un avantage compétitif quelconque (Hamilton et al 2002).

2 Gestion de la résistance des insectes (IRM)

Nous renvoyons le lecteur intéressé par une discussion plus détaillée aux publications (Roush 1999, Benedict and Altman 2002, Fitt 2002/In Press) qui ont discuté de la possibilité que les insectes développent une résistance au coton Bt. L'intention ici

est de fournir une vue générale sur la gestion de la résistance des insectes qui est en place depuis six ans, depuis que le coton a été commercialisé pour la première fois en 1996.

Il ne fait aucun doute que le potentiel de développer une résistance est un défi important pour le déploiement effectif du coton Bt, mais cette problématique s'applique aussi lors du développement d'un insecticide performant ou d'un autre moyen de contrôle. L'expérience de la sélection végétale traditionnelle dans l'augmentation de la résistance des plantes cultivées aux insectes, et plus particulièrement celle du développement d'insecticides pour contrôler les insectes nuisibles chez le coton soutient l'argumentation selon laquelle une stratégie de gestion de l'apparition de résistances chez les insectes est essentielle pour préserver la durabilité de l'efficacité du produit, quelle que soit son origine ou le mode de contrôle. Dans l'exemple spécifique des nuisibles du coton et de Bt, il y a de bonnes preuves que l'anthonome, *Helicoverpa armigera*, ainsi que les autres Lépidoptères nuisibles ont développé une résistance à une multitude d'insecticides. La résistance à des pulvérisations de Bt actuel s'est aussi développée dans les populations de la teigne des crucifères (*Plutella xylostella* (L.)) dans les champs (Tabashnik 1994). Par conséquent, il est critique que le Bt et les autres gènes qui confèrent une résistance aux principaux Lépidoptères nuisibles puissent être gérés et déployés avec responsabilité et efficacité dans le cadre d'une stratégie IRM. Il faut aussi reconnaître que différentes stratégies IRM pourraient être développées pour répondre à des besoins différents. Par exemple, les besoins typiques d'un petit fermier cultivant moins d'un hectare de coton dans un pays en voie de développement sont différents de ceux des grands fermiers cultivant un large bloc de 100 hectares ou plus de coton Bt dans un pays industrialisé. Des stratégies IRM appropriées ont été développées dans les pays où le coton Bt a été commercialisé, impliquant habituellement des entités des secteurs publics et privés travaillant ensemble dans le but de préserver la durabilité de la résistance.

Alors que des stratégies IRM spécifiques doivent être développées pour répondre aux besoins du système particulier de production de coton, les facteurs ayant un impact sur le développement de la résistance à Bt, les insecticides conventionnels ou les plantes conventionnelles résistantes hôtes sont les mêmes (Head et al., in Press b; Shelton et al 2000, Roush 1997). Ces trois facteurs sont :

- Les spécifications des sources de résistance et son déploiement (par ex. les fortes doses et les refuges).
- La génétique de la résistance aux insectes (fréquence et dominance des allèles conférant la résistance).
- Le comportement des insectes, leurs mouvements et leurs accouplements.

Basé sur la connaissance des trois facteurs ci-dessous, des stratégies IRM spécifiques ont été développées pour la production spécifique du coton qui comprend :

- L'expression spatiale et temporelle appropriée du gène Bt,
- Des refuges appropriés dans lesquels des insectes nuisibles susceptibles peuvent se croiser et se multiplier,
- Une utilisation de Bt en association avec d'autres moyens de contrôles dans une stratégie IPM,
- Le développement et le déploiement d'autres gènes qui confèrent le contrôle basé sur différents mécanismes ou

- modes d'action,
- Un système de surveillance pour détecter la résistance et un plan pour mettre en œuvre des mesures correctrices.

Lors de l'examen du coton Bt pour autorisation aux USA en 1995, les discussions entre l'EPA (Agence américaine de Protection de l'Environnement) et Monsanto (Roush 1997) ont permis d'inclure un plan IRM dans l'inscription du Bollgard® au catalogue des variétés, ce qui est un fait sans précédent. Le plan IRM développé est le résultat de la collaboration entre l'USDA (Département de l'Agriculture américain), les universités et Monsanto afin d'élaborer une stratégie de déploiement sur le court, moyen et long terme (Table 1). La stratégie IRM américaine représente un programme à court terme utilisant une forte dose de Bt, des refuges, des pratiques agronomiques qui limitent l'exposition des nuisibles à la protéine active. Ceci a été mis en place en association avec une stratégie IPM et un système de surveillance rigoureux pour la détection précoce de l'apparition de résistances. Cette stratégie à court terme est renforcée par une stratégie à moyen terme consistant à développer un coton Bt comportant deux gènes, une stratégie de correction et une « option de refuge communautaire » pour promouvoir la flexibilité de culture et un maximum de conformité IRM. La stratégie à long terme comprend tous les éléments du court et moyen terme. Elle intègre aussi la résistance de la plante hôte et d'autres nouveaux gènes insecticides, ainsi que la détermination de l'importance des hôtes alternatifs en tant que contributeurs pour le refuge global. Il convient de noter que depuis ses débuts en 1996, la stratégie américaine a montré son efficacité et que les projets clefs prévus comme le Bollgard® II ont été développés. Le Bollgard® II est maintenant autorisé en Australie et prêts pour la libération délibérée aux USA. De façon similaire, l'IRM rigoureux en Australie, mis en oeuvre avec succès depuis 1996, a déjà été révisé pour incorporer le Bollgard® II en 2002. La Chine a mis en oeuvre avec succès une stratégie IRM différente privilégiant l'utilisation d'un gène résultant de la fusion d'un gène Bt avec le gène CpTi et un système de surveillance rigoureux. D'autres pays cultivant le coton Bt comme l'Inde, l'Indonésie, le Mexique, l'Argentine et l'Afrique du Sud ont eux aussi développé et mis en œuvre des stratégies IRM pour répondre aux besoins spécifiques et ont empêché le développement d'une résistance jusqu'à présent.

L'utilisation de coton Bt transgénique doit faire l'objet d'une attention rigoureuse (Gould 1998) parce que les insectes nuisibles du coton subissent une sélection continue tout au long de la saison. Le développement de résistance pourrait compromettre l'utilisation de Bt par pulvérisations par les fermiers y compris les fermiers biologiques. C'est une préoccupation particulière de beaucoup d'ONG qui s'opposent aux biotechnologies. Dès l'introduction du coton Bt en 1996, quelques détracteurs ont prédit que le développement de la résistance était imminent. En fait, les détracteurs ont allégué que la résistance s'est déjà développée. Mais jusqu'à maintenant, les études n'ont jamais pu confirmer ces allégations. Bien que le risque que la résistance se développe soit réel, nécessitant la mise en œuvre d'une stratégie IRM rigoureuse, il est également important de reconnaître que des bénéfices significatifs ont déjà été obtenus à la suite de la plantation de 13 millions d'hectares de coton Bt au niveau mondial depuis 1996. Si le coton Bt n'avait pas été déployé en 1996, ces bénéfices importants n'auraient pas

Table 1. Stratégie de la gestion de la résistance des insectes pour le coton Bollgard®

COURT TERME

- Forte dose de protéine active pour contrôler les insectes avec des allèles hétérozygotes pour la résistance.
- Refuges de variétés de coton non-Bt pour produire des insectes susceptibles.
- Pratiques agronomiques qui minimisent l'exposition des insectes à la protéine active.
- Gestion intégrée des nuisibles pour augmenter les insectes utiles et réduire l'utilisation d'insecticides conventionnels.
- Surveillance des populations d'insectes cibles pour la sensibilité à la protéine active.
- Etude des performances du coton Bt, spécialement toutes les "défaillances". Enquêter sur les causes.

MOYEN TERME

- Continuer avec la stratégie à court terme
- Développement d'une stratégie de réparation
- Option de communauté de refuge pour promouvoir une flexibilité de culture et une observation maximum de l'IRM
- Combiner deux gènes insecticides avec différents sites cibles et différents modes d'action

LONG TERME

- Continuer avec les stratégies à court et moyen termes plus:
- Des options supplémentaires de refuges pour promouvoir la flexibilité de culture et une observation maximum de l'IRM
- Améliorer l'intérêt des hôtes alternatifs comme contributeurs au refuge global
- Incorporer les traits de résistance de la plante hôte dans le coton Bt
- Incorporer d'autres gènes insecticides nouveaux

Sources: Mullins, 2002 Communication personnelle. Version modifiée de Benedict and Altman (2001) reproduite avec l'autorisation des auteurs, J.H. Benedict and D.W. Altman du chapitre 'Commercialization of Transgenic Crops Expressing Insecticidal Crystal Protein' pp. 137-201 dans J.J. Jenkins and S. Saha (ed) Genetic Improvement of Cotton: Emerging Technologies. Publié par Science Publications, Enfield, N.H., USA

IRM développé conjointement par Monsanto, l'USDA et les Universités

été réalisés à un coût d'opportunité formidable pour les millions de fermiers qui cultivent ces 13 millions d'hectares de coton Bt dans huit pays. Il convient de noter que malgré les prédictions des détracteurs affirmant le contraire, la résistance des insectes au coton Bt n'a pas encore été détectée dans les larges surfaces cultivées mondialement avec du coton Bt. Depuis l'introduction du coton Bt en 1996, le gène Bt Cry1Ac, le gène fusionné Cry1Ab/Cry1Ac, et le gène de la trypsine de la Mongette ou Niébé (*Vigna unguiculata*) CpTi a été utilisé avec succès pour conférer une résistance contre les Lépidoptères nuisibles du coton. Notamment, entre-temps, le Bollgard® II qui a été développé amène une seconde ligne de défense et un contrôle plus efficace. Le Bollgard® II est déjà approuvé en Australie pour la saison 2002/2003 et une autorisation est pendante aux USA en 2003. D'autres produits attendus à moyen terme comprennent un coton Bt avec un double gène (Cry1Ac et Cry1F) de Dow AgroSciences en 2004 et un coton résistant aux insectes avec un gène VIP de Syngenta la même année. Les secteurs publics et privés à la fois dans les pays en développement (Chine et Inde) et industriels (USA et Australie) ont des programmes évolutifs visant à développer de nouveaux gènes Bt et autres ainsi que l'incorporation de l'amélioration conventionnelle de la résistance dans les plantes hôtes.

Ainsi, en résumé, le développement et la mise en œuvre de stratégies IRM en même temps que l'introduction du coton Bt en 1996, et son expansion pour couvrir environ 4,3 millions d'hectares en 2001, ont représenté une contribution significative pour le déploiement performant des gènes Bt. La société a mis une forte valeur ajoutée dans le coton Bt car il peut réduire de moitié le volume des insecticides conventionnels à large spectre utilisés sur le coton ce qui s'accompagnera de bénéfices économiques, environnementaux et sociaux et aura des implications pour la santé des producteurs, spécialement les petits fermiers des pays en voie de développement. Il est rassurant de savoir que les plans initiaux pour élargir et diversifier les mécanismes de résistance se matérialisent en terme de nouveaux produits autorisés comme le Bollgard® II et que d'autres nouveaux gènes Bt et nouveaux gènes de résistances sont attendus à moyen terme. Cependant, ces prévisions ne doivent pas conduire à l'autosatisfaction et à un relâchement de la rigueur avec laquelle les stratégies de gestion de la résistance des insectes ont été mises en œuvre par les fermiers des petites et les grandes exploitations des pays en voie de développement et des pays industrialisés. Il serait appréciable maintenant de provoquer un examen international des stratégies de la gestion de résistances aux insectes qui renforcerait les connaissances considérables et l'expérience acquise jusqu'ici et utilisée pour développer une stratégie internationale et en guider la réalisation parallèlement future expansion du coton à l'échelle mondiale à moyen terme. Ceci serait particulièrement important pour le grand nombre de pays en voie de développement qui pourraient bénéficier du coton Bt mais nécessite une assistance pour s'assurer que le coton Bt est déployé de façon efficace.

References

Badawy, H.M.A. and S.A. El-Arnaouty. 1999. Direct and indirect effects of some fungicides on *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). J. Neuropterol. 2: 67-74.

- Benedict, J. and D.W. Altman. 2001. Commercialization of transgenic cotton expressing insecticidal crystal protein. In Jenkins, J. and S. Saha (eds). Genetic Improvement of Cotton: Emerging Technologies. Science Publications, Enfield, New Hampshire, USA. 8: 137-201.
- Betz, F., B. Hammond and R. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 32: 156-173.
- Edge, J.M., J.H. Benedict, J.P. Carroll and H.K. Reding. 2001. Bollgard® cotton: An assessment of global economic, environmental, and social benefits. The Journal of Cotton Science. The Cotton Foundation. 5: 121-136. <http://www.jeotsci.org>
- Fitt, G.P. 2002. Personal communication. Deployment and impact of transgenic Bt cottons in Australia. In Kalaitzandonakes, N.G. (ed). Global Impacts of Biotechnology. Kluwer (In Press).
- Fuchs, R.L., J.E. Ream, B.G. Hammond, M.W. Naylor, R.M. Leimgruber and S.A. Berberich. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. Bio/Technology. 11: 1543-1547.
- Gianessi, L.P. and Carpenter, J.E. 1999. Agricultural biotechnology: Insect control benefits. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington DC, USA.
- Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. Ann. Rev. Entomol. 43: 701-726.
- Hamilton, K.A., R.E. Goodman and R.L. Fuchs. 2002. Safety assessment of insect-protected cotton. In Thomas, J.A. and R.L. Fuchs (eds). Biotechnology and Safety Assessment. Academic Press, London, UK.
- Head, G., B. Freeman, W. Moar, J. Ruberson and S. Turnipseed. In Press a. Natural enemy abundance in commercial Bt cotton and conventional cotton fields in the USA.
- Head, G.B., K.S. Mohan, K.S. Ravi and W. Green. In Press b. Adapting insect resistance management strategies for transgenic Bt crops in local needs.
- Head, G., B. Freeman, B. Mina, W. Moar, J. Ruberson and S. Turnipseed. 2001. Natural enemy abundance in commercial Bollgard® and conventional cotton fields. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Memphis, TN, USA. National Cotton Council. 2: 796-798.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). 2000. Environmental health criteria, 217: *Bacillus thuringiensis*. http://www.who.int/pcs/docs/ehc_217.html
- James, C. 2002. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2001 Feature: Bt Cotton. ISAAA Briefs No. 26. ISAAA: Ithaca, NY.
- Mullins, W. 2002. Personal communication.
- Niles, G.A. and C.V. Feaster. 1993. Breeding. In Kohel, R.J. and Lewis C.F. (eds). Cotton. Agronomy No. 24, Soil Science Society of America, Inc., Wisconsin, USA. pp. 202-232.
- Percival, A.E., J.F. Wendel and J.M. Stewart. 1999. Taxonomy and germplasm resources. In Smith, W.C. (ed). Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley and Sons, Inc. pp. 33-63.
- Roof, M.E. and J.A. DuRant. 1997. On-farm experiences with Bt cotton in South Carolina. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. National Cotton Council, Memphis, TN, USA. pp. 861.
- Roush, R.T. 1999. Strategies for resistance management. In Hall, F.R. and J.J. Menn (eds). Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press, Totawa, NJ, USA.
- Roush, R.T. 1997. Bt-transgenic crops: Just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? Pestic. Sci. 51: 328-344.
- Shelton, A.M., J.D. Tang, R.T. Roush, T.D. Metz and E.D. Earle. 2000. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. Nature Biotechnol. 18: 339-342.
- Smith, R.H. 1997. An extension entomologist's 1996 observations of Bollgard® (Bt) technology. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. 2: 856-858.
- Tabashink, B.E. 1994. Delaying insect adaptation to transgenic crops: Seed mixtures and refugia reconsidered. Proc. Royal Society London. Series B, 255: 7-12.
- USEPA. 1988. Guidance for the re-registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. NTIS Publication 89-164198. National Technical Information Service, Springfield, VA, USA.
- USFDA. 1994. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals: Aminoglycoside 3' Phosphotransferase II. Federal Register. 59(98): 26700-26711.

