

EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Parte I:

Principios y prácticas para la evaluación de la seguridad ambiental de los cultivos genéticamente modificados

Caso de estudio: evento de maíz MON810

La información contenida en este manual fue preparada y publicada por AGBIOS, y traducida al español por ArgenBio. Las referencias bibliográficas correspondientes, los enlaces relacionados, así como la descripción de otros eventos, están disponibles en www.agbios.com

AGBIOS es una compañía dedicada a brindar su experiencia en evaluación de riesgo y políticas públicas y regulatorias relacionadas con los productos de la biotecnología.

www.agbios.com

ArgenBio (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología) es una institución sin fines de lucro que tiene como misión divulgar información sobre la biotecnología, contribuyendo a su comprensión a través de la educación y estimulando su desarrollo.

www.argenbio.org

EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

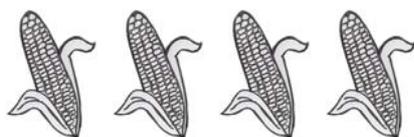
Parte I:

Principios y prácticas para la evaluación de la seguridad ambiental de los cultivos genéticamente modificados

Caso de estudio: evento de maíz MON810

Índice:

Capítulo 1 - Descargo de responsabilidades y prefacio	Pág. 3
Capítulo 2 - Conceptos y principios	Pág. 5
Capítulo 3 - La Biología de <i>Zea mays L. ssp. Mays</i>	Pág. 9
Capítulo 4 - El organismo donante	Pág. 11
Capítulo 5 - Método de transformación	Pág. 15
Capítulo 6 - Caracterización molecular del ADN insertado	Pág. 22
Capítulo 7 - Estabilidad genética de la característica introducida	Pág. 27
Capítulo 8 - Material expresado / efecto	Pág. 29
Capítulo 9 - Transferencia génica a plantas emparentadas	Pág. 39
Capítulo 10 - Transferencia génica a organismos no emparentados	Pág. 41
Capítulo 11 - Potencial de comportarse como maleza	Pág. 46
Capítulo 12 - Efectos adversos secundarios y no intencionales	Pág. 48
Capítulo 13 – Manejo de resistencia de insectos	Pág. 62
Apéndice 1 - La biología del maíz	Pág. 70
Apéndice 2 - Degradación aeróbica de la proteína Cry1Ab en el suelo	Pág. 84
Apéndice 3 - Toxicidad potencial de la proteína Cry1Ab para especies no blanco	Pág. 88
Glosario	Pág. 100





Capítulo 1 - Descargo de responsabilidades y prefacio

Descargo de responsabilidades

La firma Monsanto ha cedido generosamente la información provista en varias de las presentaciones regulatorias del evento MON810 como herramienta de práctica. Nótese, sin embargo, que con el propósito de incrementar la utilidad del caso de estudio como herramienta de práctica, se han tomado ciertas libertades con respecto a la información provista en las solicitudes originales. La información presentada en este estudio es sólo una parte de la presentada en realidad. El caso de estudio no constituye de forma alguna una solicitud completa ni debe ser considerado como una evaluación de riesgo completa. Por eso, el uso de esta información como herramienta de práctica no constituye una aprobación de la información ni del producto, ni debe ser considerada como un fiel reflejo de las presentaciones originales.

Prefacio

Este módulo educativo ha sido desarrollado como una herramienta para proveer a los organismos reguladores (y sus miembros) de un entrenamiento práctico en la evaluación de la seguridad ambiental de las plantas transgénicas. Los conceptos de evaluación de riesgo, tal como se discuten en este texto, no reflejan el enfoque regulatorio de ningún país en particular, sino que más bien han sido formados en base a documentos de consenso internacional, como los emitidos por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) de las naciones Unidas (ONU).

Con el fin de proveer información similar a la usualmente presentada para avalar la evaluación ambiental, se ha desarrollado un caso de estudio usando el evento MON810 de maíz (*Zea mays*), obtenido por técnicas de ingeniería genética, y su progenie. El contenido del estudio incluye extractos de solicitudes presentadas ante autoridades regulatorias de Japón, Unión Europea, Reino Unido, y Estados Unidos (EE.UU.).

La línea MON810 de maíz (nombre comercial YieldGard®) fue desarrollada por medio de una modificación genética específica para que sea resistente al ataque del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), un insecto plaga del maíz de gran importancia agronómica. La nueva variedad produce una versión truncada de la proteína insecticida, Cry1Ab, derivada de *Bacillus thuringiensis*. Las delta-endotoxinas, como la proteína Cry1Ab expresada en MON810, actúan uniéndose selectivamente a sitios específicos localizados en las microvellosidades del epitelio del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Luego de la unión, se forman poros permeables a cationes que alteran el flujo iónico en el intestino medio, causando así la parálisis y posterior muerte del insecto susceptible. Cry1Ab presenta actividad insecticida sólo contra insectos lepidópteros, y su especificidad de acción se atribuye directamente a la presencia de sitios de unión específicos (receptores) en los insectos blanco. No existen dichos sitios de unión a delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo tanto, ni el ganado ni el hombre son susceptibles a estas proteínas.

El evento MON810 recibió su primera aprobación regulatoria en EE.UU. en 1995 (USDA, Departamento de Agricultura de EE.UU.), y desde entonces ha sido aprobado para liberación al medioambiente y para uso en alimentación animal y/o humana en varios países, incluyendo Argentina, Canadá, Japón, Sudáfrica y Unión europea (Tabla 1).

Tabla 1. Situación de aprobaciones regulatorias del maíz resistente a insectos evento MON810

País	Ambiental (Año)	Alimentación humana y/o animal (Año)	Comercialización (Año)
Argentina	1998	1998	
Australia		2000	
Bulgaria	2000	2000	
Canadá	1997	1997	
Unión Europea	1998		1998
Japón	1996	1997	
Rusia		2000	
Sudáfrica	1999	1999	
Suiza		2000	
Reino Unido		1997	
Estados Unidos	1996	1996	

Nota aclaratoria sobre los estándares de calidad para la documentación de las solicitudes de aprobación regulatoria

La evaluación de una solicitud para liberación ambiental es comparable a la revisión exhaustiva por profesionales expertos de un manuscrito para su publicación en una revista científica. Por consiguiente, la calidad del texto y de la información presentada debe estar a un nivel acorde con ello.

Los procedimientos experimentales se deben describir en detalle suficiente (o citados en forma acorde) como para que la metodología pueda ser repetida. La redacción y estilo idiomático deben ser estándar y se debe evitar el uso de la jerga de laboratorio. Se recomienda la adopción de nomenclatura estándar internacional, como las descritas en los *International Union of Biochemistry and Molecular Biology's Biochemical Nomenclature and Related Documents (1992) 2nd Ed. Portland Press, Inc., Chapel Hill, NC*, los cuales contienen las reglas de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (*International Union of Biochemistry*) para aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, vitaminas, coenzimas, quinonas, ácido fólico y compuestos relacionados, corrinoídes, lípidos, enzimas, proteínas, ciclitoles, esteroides, carbohidratos, carotenoides, hormonas peptídicas, e inmunoglobulinas humanas. Se deben utilizar los nombres químicos correctos y se deben especificar las cepas de los organismos. Se deben identificar los nombres comerciales. Cuando sea posible, se deben usar los símbolos y unidades del Sistema Internacional.

Las ilustraciones, tablas y figuras deben ser claras y legibles. Se aceptan ilustraciones originales, fotografías de alta calidad o impresiones láser, pero no las reproducciones de baja calidad que usualmente son el resultado de impresiones fotocopiadas. Particularmente, las reproducciones de geles o transferencias (*blots*) deben ser de una calidad suficiente como para mostrar en forma clara los resultados.



Capítulo 2 – Conceptos y principios

Históricamente, el mejoramiento de plantas y animales se ha llevado a cabo sobre la base de prueba y error. En el caso de las plantas, esta selección artificial se basaba en la apariencia saludable, en el crecimiento vigoroso, en mayores rendimientos, y en la apariencia, aroma y sabor deseados para la parte comestible. Esta situación cambió hacia fines del siglo XIX y principios de XX cuando el mejoramiento vegetal evolucionó de arte cualitativo a ciencia cuantitativa. Los avances en las técnicas de mejoramiento vegetal fueron acompañados por la introducción segura de variedades de cultivos para fibra y alimentación con un mayor rendimiento y con caracteres mejorados para características de calidad y de tolerancia a estreses bióticos y abióticos. El largo historial de uso seguro, asociado con la introducción de nuevas variedades vegetales indica: i) que los cultivos presentan bajos riesgos ambientales, ii) que los ensayos a campo previos al uso comercial y la evaluación y toma de decisiones institucionales acerca de qué variedades cultivar han sido medidas apropiadas, y/o iii) que las prácticas de manejo en cada sitio han sido suficientes para mitigar cualquier riesgo asociado a una nueva variedad (Cook, 1999). Casi sin excepción, las nuevas variedades se han introducido al sistema comercial en forma segura con muy poca, o nula, evaluación de las consecuencias ambientales debidas a su establecimiento.

En los últimos 20 años, la aplicación de herramientas de biología molecular ha permitido obtener plantas con caracteres que no podrían haber sido introducidos por técnicas de mejoramiento tradicional. A pesar de que la biotecnología moderna amplía las posibilidades de cambios genéticos que se pueden introducir en las plantas, no origina en particular plantas que sean menos seguras que las producidas con técnicas más convencionales (NAS, 1987; NRC, 1989). No existen evidencias que indiquen que el método utilizado para producir una nueva variedad vegetal (tanto sea producto del mejoramiento convencional o de ingeniería genética) pueda ser usado como indicador efectivo *a priori* del impacto ambiental o seguridad alimentaria de dicha planta. No obstante, el uso de tecnologías de ADN recombinante para producir plantas mejoradas por ingeniería genética ha conducido al desarrollo de sistemas regulatorios gubernamentales/institucionales en todo el mundo que se aplican específicamente para evaluar la bioseguridad de dichas plantas.

En 1993, la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD por sus siglas en inglés *Organization of Economic Cooperation and Development*) publicó los principios generales que sus países miembros concluyeron deberían aplicarse a la producción y comercialización a gran escala de plantas mejoradas por ingeniería genética. Según la OECD:

“La bioseguridad en biotecnología se consigue por medio de la aplicación apropiada del análisis de riesgo/seguridad y del manejo del riesgo. El análisis de riesgo/seguridad comprende la identificación del riesgo y, si se identifica algún riesgo, el análisis también comprende la evaluación de dicho riesgo. El análisis de riesgo/seguridad se basa en las características del organismo, la característica introducida, el medioambiente en el cual el organismo será introducido, la interacción entre ellos, y el uso propuesto. El análisis de riesgo/seguridad se realiza con anterioridad a la acción deseada y es típicamente un componente de la rutina de investigación, desarrollo y evaluación de nuevos organismos, tanto se lleven a cabo en un laboratorio o a campo. El análisis de riesgo/seguridad es un procedimiento científico que no implica ni excluye la supervisión regulatoria ni tampoco implica que cada caso será necesariamente revisado por una autoridad nacional o de otro tipo.”

En resumen, la evaluación de riesgos de plantas obtenidas por ingeniería genética debería basarse en evidencias científicas sólidas y debería aplicarse “caso por caso”.

Familiaridad

Para poder evaluar la seguridad ambiental de una planta modificada por ingeniería genética, se debe estar familiarizado con la biología de la propia planta, como así también con las prácticas agrícolas o de silvicultura que se emplean para su cultivo. Este concepto de familiaridad es un enfoque clave usado en la identificación y evaluación de riesgos ambientales que puedan estar asociados con la liberación al ambiente de la planta modificada por ingeniería genética y también es un concepto clave para proveer información sobre prácticas de manejo que puedan ser necesarias para tratar los riesgos reconocidos. La familiaridad considera la biología de las especies vegetales, la característica introducida, y las prácticas agrícolas usadas en la producción del cultivo, cada una de las cuales se presentan brevemente a continuación, y son tratadas en mayor detalle en los capítulos siguientes.

La biología de las especies vegetales

Una de las herramientas de referencia más utilizada, a la hora de realizar una evaluación de seguridad ambiental de una planta transgénica, es una monografía detallada que describa la biología de la especie en estudio. En particular, puede ser útil para identificar características específicas de cada especie que se puedan ver afectadas por la característica nueva como para permitir que la planta transgénica se comporte como maleza invasora de hábitats naturales, o resultar perjudicial de algún otro modo para el medioambiente. La monografía también puede brindar detalles sobre interacciones significativas entre la planta y otras formas de vida que deban ser evaluadas en el análisis de impacto. Normalmente dicho documento incluye lo siguiente:

- Descripción taxonómica
- Uso y consumo de la planta
- Su cultivo a nivel regional/nacional, producción de semilla y prácticas agronómicas
- Biología reproductiva de la especie, incluyendo detalles sobre la polinización, los mecanismos de dispersión del polen y las semillas, y cualquier otro medio de flujo génico
- Ocurrencia y viabilidad de híbridos intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos.
- Detalles sobre el centro de origen y diversidad genética de las especies vegetales
- Detalles sobre la ploidía de la especie cultivada, sus progenitores y cualquier especie sexualmente compatible
- Distribución y ecología de especies relacionadas o biotipos silvestres, incluyendo cualquier evidencia de potencial de maleza
- Enfermedades y plagas comunes
- Interacciones potenciales con otros organismos tales como polinizadores, hongos formadores de micorrizas, animales herbívoros, aves, microbios e insectos del suelo

Los documentos consenso detallados que describen la biología de las siguientes especies cultivadas han sido desarrollados por la OECD (ver <http://www.oecd.org/ehs/cd.htm>): *Oryza sativa* (arroz), *Triticum aestivum* (trigo panadero), *Solanum tuberosum* (papa) y *Brassica napus* (canola argentina). Análogamente, la Agencia de Inspección Alimentaria Canadiense (Canadian Food Inspection Agency) ha publicado monografías sobre la biología de *B. napus* (canola argentina), *B. rapa* (colza o canola de Polonia), *Linum usitatissimum* (lino), *Zea mays* (maíz), *S. tuberosum* (papa), *Glycine max* (soja) y *T. aestivum* (trigo panadero) (ver <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/pbo/biodoce.shtml>). Estos documentos pueden ser utilizados tanto como fuentes confiables de información acerca de las especies en estudio, como también de modelos para la preparación de monografías. Sin embargo, es importante tener en cuenta que mayormente el valor biológico de los documentos se encuentra en la información específica provista por cada país acerca de las especies vegetales. Los

documentos consenso como los publicados por la OECD deben ser complementados de modo que reflejen las condiciones de cada región.

La nueva característica

La ingeniería genética permite introducir elementos genéticos nuevos que pueden resultar en la expresión de una nueva característica o la modificación de una característica existente. El riesgo ambiental asociado a la liberación de una planta genéticamente modificada, sin embargo, no está determinado por lo novedoso del elemento genético usado para transformarla, sino por lo novedosa que resulta la planta en sí misma. Se puede obtener información útil al evaluar si una característica expresada en una planta transgénica es similar a características ya introducidas en esa misma especie. Por ejemplo, el impacto potencial de introducir un gen de resistencia a hongos con respecto a la persistencia de una planta transgénica puede ser analizado, en parte, evaluando el efecto que tuvieron, cuando fueron liberadas, las variedades con la misma característica de resistencia fúngica pero mejoradas convencionalmente.

Prácticas agrícolas o de silvicultura

Los cambios en las prácticas agrícolas asociados a la introducción de la nueva variedad vegetal, incluyendo (pero no limitados a) las plantas transgénicas, pueden tener impactos ambientales significativos. El amplio cultivo de *B. napus* (canola) tolerante a herbicidas (TH) en las praderas de Canadá les permitió a los productores agropecuarios cambiar al sistema de siembra directa (o “labranza cero”). Los productores pueden sembrar canola TH directamente sobre el rastrojo del cultivo previamente cosechado sin necesidad de laboreo previo. Esta situación es beneficiosa tanto para la conservación del suelo (el rastrojo del cultivo anterior retiene la capa superior del suelo en su lugar) como también para la conservación del agua (la capa de rastrojo permite una mejor retención del agua e impide su evaporación).

Las plantas transgénicas que expresan genes de tolerancia a estrés son de gran interés, particularmente para la producción en suelos dañados por salinización o alcalinización, o en ambientes donde el agua es un factor limitante para la producción de alimentos. La tolerancia al estrés también puede ser utilizada para extender las zonas típicas de producción de un cultivo. Por ejemplo: la tolerancia al frío es considerada una característica deseada ya que puede usarse para limitar el daño a los cultivos causado por las heladas y, consecuentemente, extender en el tiempo las estaciones de producción. La tolerancia al frío también puede permitir la introducción de nuevas plantas en áreas donde previamente no se las ha cultivado. Esta situación se asemeja a la introducción de una especie exótica y, por lo tanto, requiere del mismo examen exhaustivo para determinar la potencial perturbación del ecosistema.

Equivalencia sustancial

Al realizar la evaluación del impacto ambiental de las plantas transgénicas, el concepto de familiaridad está unido al de equivalencia sustancial. Este último está basado en el principio de que las nuevas plantas pueden ser comparadas con sus contrapartes no transformadas, que ya cuentan con un historial de uso seguro establecido. El objetivo es determinar si la planta nueva presenta algún riesgo nuevo o mayor en comparación con su contraparte tradicional, o si puede ser usado indistintamente a su contraparte tradicional sin afectar negativamente el medioambiente en el que se lo cultive. El propósito no es establecer un nivel absoluto de seguridad, sino más bien un nivel relativo de seguridad, de modo que haya una certeza razonable de que no resultará un riesgo indebido para el medioambiente a partir del cultivo de la nueva planta bajo las condiciones previstas de producción.

La aplicación de equivalencia sustancial requiere que se disponga de suficiente información analítica en la literatura o que se genere por medio de la experimentación, de modo de permitir la comparación efectiva entre la nueva planta y su contraparte tradicional. En este contexto, se evidencia un problema, ya que en términos generales no se han establecido factores de riesgo para las variedades vegetales obtenidas por cruzamiento tradicional, y, por lo tanto, existe muy

poca información de base acerca del riesgo ambiental asociado a su introducción. Este hecho sugiere una limitación básica en el concepto de equivalencia sustancial: la dependencia de un comparador (o par), y de la información disponible o que se pueda generar para el comparador, significa que una evaluación positiva de seguridad está relacionada a los componentes evaluados para el comparador en particular. La elección del comparador es, por lo tanto, crucial para la aplicación efectiva del concepto de equivalencia sustancial.

Consideraciones sobre la seguridad

El objetivo de la evaluación de riesgo ambiental de las plantas genéticamente modificadas es identificar y evaluar el riesgo asociado a la liberación y cultivo de estas plantas en comparación con una contraparte que tiene un historial de uso seguro. Entre los países que tienen programas regulatorios establecidos para la evaluación de riesgo ambiental de las plantas transgénicas, existen incumbencias en común sobre bioseguridad que deben ser evaluadas caso por caso previamente a la comercialización de un nuevo cultivo (OECD, 2000). Además de la información sobre el organismo receptor (descrita en párrafos anteriores) y sobre el organismo dador, particularmente si el organismo dador u otros miembros de su género normalmente muestran características de patogenicidad o toxicología ambiental, o tienen otras características que afecten la salud humana, estas incumbencias incluyen:

- Caracterización molecular y estabilidad de la modificación genética
- Transferencia génica a plantas emparentadas
- Transferencia génica a plantas no emparentadas
- Potencial de comportarse como maleza
- Efectos adversos secundarios e indeseados

Referencias

1. Cook, R.J. (1999). Science-based risk assessment for the approval and use of plants in agricultural and other environments. *In: Agricultural Biotechnology and the Poor: Proceedings of an International Conference*. Persley, G.J., Lantin, M.M. (eds.). Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR), Washington. p. 123-130.
2. NAS (1987). Introduction of recombinant DNA-engineered organisms into the environment: Key issues. National Academy of Sciences, Washington, D.C. 24 p.
3. NRC (1989). Field testing genetically modified organisms. National Academy of Sciences, Washington, D.C. 170 p.
4. OECD (2000). Report of the working group on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology. Organization for Economic Cooperation and Development, C(2000)86/ADD2, Paris.



Capítulo 3 - La Biología de *Zea mays* L. ssp. *Mays*

Se presenta una revisión detallada sobre la biología de *Z. mays* en el **Apéndice 1**: La biología de *Zea mays* y su cultivo en el sudeste de Asia.

CASO DE ESTUDIO MON810

Variabilidad genética y fenotípica

El comportamiento y las características de la línea de maíz MON810 han sido estudiados en un cierto rango de ambientes a campo en Estados Unidos y Europa desde 1992. La evaluación de la interacción de MON810 con el entorno ha incluido estudios sobre: susceptibilidad a insectos y enfermedades, capacidad de supervivencia (plantas guachas o espontáneas), capacidad de multiplicación de las semillas (rendimientos), expresión de la proteína Cry1Ab en hojas y grano, análisis composicional de la semilla, inocuidad para aves y mamíferos. No se han observado diferencias significativas entre esta línea y otras variedades de maíz, aparte de la protección contra ciertos insectos lepidópteros.

Modos y/o tasa de reproducción

Las exhaustivas observaciones registradas por los co-operadores de campo en los ensayos a campo en 1993, 1994 y 1995 demostraron que el modo y la tasa de reproducción de MON810 son las típicas de otras variedades de maíz. Esta línea de maíz sigue exhibiendo las mismas características de inflorescencias estaminadas o masculina (panoja) y pistiladas o femenina (mazorca) por separado. El polen se produjo enteramente en la inflorescencia estaminada con la antesis (dispersión del polen) en sincronía con la emergencia de las barbas (pistilos). No se han observado diferencias en la madurez de la semilla o la planta. En algunos ensayos, las plantas no protegidas contra insectos maduraron más rápidamente debido a la senescencia prematura causada por el daño de perforación del tallo por los insectos.

Niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, CP4 EPSPS, GOX y NPTII

La expresión de las proteínas en hoja joven, grano, planta entera y polen cosechados de seis localidades experimentales en 1994 se determinó por medio de ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA) (Harlow & Lane 1988) y de Western blot (Matsudaira 1987). Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de los niveles de proteínas específicas medidos en tejidos de MON810¹ ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco)

Proteína	Hoja	Grano	Planta ^{2,3}	Polen ²
Cry1 Ab	9,35	0,31	4,15	0,09
CP4 EPSPS	ND ⁴	ND	ND	NA ⁵
GOX	ND	ND	ND	NA
NPTII	NA	NA	NA	NA

1. Los valores son medias calculadas del análisis de seis muestras vegetales, una de cada uno de los seis sitios (a menos que se indique lo contrario)

2. La media se calculó del análisis de muestras vegetales de un sitio

3. Los valores son medias calculadas del análisis de dos muestras vegetales réplicas de un sitio

4. No detectado.

5. No analizado.

Características de rendimiento

Las comparaciones de rendimiento para MON810 y líneas controles representativas se evaluaron hasta en nueve localidades de Estados Unidos. La comparación entre un híbrido no transgénico y el mismo híbrido con un parental obtenido por retrocruza derivada de la línea MON810 no mostró diferencias significativas entre dichos híbridos en lo que respecta al rendimiento (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación del rendimiento entre las versiones no transgénica y MON810 del mismo híbrido

	Rendimiento (bushels/acre) ^a
Control	147,1
MON 810	154,9
Diferencia (pos-neg)	7,8
Error estándar	+/- 4,5
Valor t	1,738
Valor p	0,089
Diferencia significativa	NO
Número de pares comparados	44

Susceptibilidad a enfermedades y plagas

MON810 fue evaluado en EE.UU. en más de sesenta plantaciones, en al menos diez estados, además de Puerto Rico. El monitoreo detallado para la determinación de susceptibilidad a enfermedades y plagas de esta línea *versus* plantas controles no transgénicas se llevó a cabo en 1993 y 1994. El examen de las plantas no se limitó a plantas con síntomas obvios de enfermedad; las plantas con aspecto saludable fueron examinadas para detectar crecimientos anormales y el desarrollo de sintomatología de enfermedad sub-crónica. No se detectaron diferencias significativas entre MON810 y las plantas no transgénicas en lo que respecta a calidad agronómica y susceptibilidad a insectos y enfermedades, más allá del control sobre el barrenador europeo del maíz. Las enfermedades observadas incluyeron el tizón foliar del Norte (*Exserohilum turcicum*), tizón foliar del Sur (*Bipolaris maydis*), pudrición foliar bacteriana (*Erwinia stewartii*), el carbón común del maíz (*Ustilago maydis*), virus del estriado del maíz (MStV) y la roya común del maíz (*Puccinia sorghi*).

Los híbridos de maíz protegidos contra insectos serán manipulados por los productores de la misma manera con que manejan el cultivo y la producción de otros híbridos de maíz en la actualidad, con la excepción de que se espera que a cada productor se le solicite que implemente un plan de manejo de resistencia de insectos (ver Manejo de Resistencia de Insectos). El objetivo del plan de manejo de insectos es retardar o impedir que los insectos blanco (susceptibles) desarrollen resistencia a la proteína Cry1Ab.

^a NT: 1 bushel de maíz pesa 25,4 kg; 1 acre equivale a 0,405 hectáreas



Capítulo 4 – El organismo donante

La información sobre la historia natural del organismo donante es necesaria, particularmente si el donante u otro miembro de su género muestran normalmente características de patogenicidad o toxicidad ambiental, o poseen otras características que afecten la salud humana.

CASO DE ESTUDIO MON810

Los genes de los organismos donantes

MON810 contiene secuencias de ADN derivadas de los siguientes organismos donantes:

- Gen *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*. El gen *cry1Ab* utilizado para producir las líneas MON810 de maíz protegido contra insectos es una versión modificada del gen *cry1Ab* aislado del ADN de *B. thuringiensis subsp. kurstaki* cepa HD-1. Originalmente se lo designó *cryIA(b)*, según la nomenclatura de Höfte y Whitely (1989), pero luego de una revisión, se lo llamó *cry1Ab* (Crickmore *et al.*, 1998). [En este módulo se usa la nomenclatura de Crickmore *et al.* (1998)]. El gen nativo de longitud completa que codifica para la proteína Cry1Ab y su secuencia nucleotídica completa fueron descritos por Fischhoff *et al.* (1987).
- Promotor 35S potenciado del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El promotor del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.* 1985) con la región potenciadora (*enhancer*) duplicada (Kay *et al.* 1985).
- El intrón del gen *hsp70* de maíz (*heat shock protein* o proteína de choque térmico). El gen *hsp70* que codifica para la proteína hsp70 provee niveles de transcripción incrementados (Rochester *et al.* 1986).
- La región 3' no traducida del gen *nopalina sintasa* (3' nos) del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. La secuencia 3' nos provee la señal de poliadenilación para la expresión estable del transgén (Fraley *et al.*, 1983).

Ninguna de las secuencias insertadas posee actividad patogénica o características perjudiciales. Las siguientes secuencias también estaban presentes en el/los plásmido/s usados en el proceso de transformación, pero NO se integraron al genoma de MON810:

- Gen marcador de selección *cp4 epsps*. El gen que codifica para la enzima CP4 EPSPS de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 fue utilizado como marcador de selección vegetal para identificar las pocas células de maíz que originalmente recibieron el gen *cry1Ab* introducido, responsable de la protección contra insectos, en las etapas iniciales de selección en el cultivo *in vitro* en el laboratorio, luego de la transformación. Las proteínas EPSPS producidas naturalmente por las plantas se encuentran en el cloroplasto. Por lo tanto, la secuencia que codifica para el péptido señal de tránsito a cloroplasto, *ctp2* del gen *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Klee & Rogers, 1987), fue fusionada al extremo amino de la proteína CP4 EPSPS con el fin de que la CP4 EPSPS sea dirigida a los cloroplastos, el sitio de actividad de EPSPS y de acción del glifosato (Kishore & Shah, 1988).
- Gen marcador (*gox*) codificante para la enzima glifosato oxidasa. El gen *gox*, clonado de *Achromobacter sp.* cepa LBAA, también fue utilizado como marcador de selección. La proteína GOX es dirigida a los plástidos por medio de la secuencia péptido señal de tránsito a cloroplasto *ctp1*, derivada del gen *ssu1A* de *Arabidopsis thaliana* (Timko *et al.*, 1988).
- Gen marcador de selección bacteriano que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (*nptII*). El gen marcador de selección bacteriano, *nptII*, aislado del transposón procariota Tn5 (Beck *et al.*, 1982), codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II, la cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos (ej.: kanamicina, neomicina) que se utilizan para la selección de *Escherichia coli* recombinantes

que contienen el plásmido de transformación. El promotor de este gen es activo únicamente en células bacterianas.

- *lac Z*. Una secuencia parcial codificante del gen *lacI* de *E. coli*, el promotor *Plac*, y una secuencia parcial codificante para la proteína beta-galactosidasa o LacZ, provenientes de pUC119 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).
- *ori-pUC*. Origen de replicación de los plásmidos pUC que permiten la replicación del plásmido dentro de *E. coli* (Vieira & Messing, 1987).
- CTP2. Secuencia del péptido señal de tránsito al cloroplasto, correspondiente a la EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee & Rogers, 1987), e incluida para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, el sitio de síntesis de los aminoácidos aromáticos.

Patogenicidad potencial del organismo donante

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (B.t.k.) es una bacteria gram-positiva formadora de esporas y estructuras cristalinas, que ha sido utilizada comercialmente durante los últimos 30 años para controlar insectos plaga. Estos microbios se encuentran naturalmente en el suelo en todas partes del mundo. Esta cepa controla insectos plaga por medio de la producción de proteínas insecticidas cristalinas conocidas como delta-endotoxinas. Para ejercer su actividad contra el insecto blanco, la proteína debe ser ingerida. En el intestino del insecto la proteína se une a receptores específicos del intestino medio, se inserta en la membrana de las células intestinales y forma poros permeables específicamente a iones. Este evento interrumpe el proceso digestivo y causa la muerte del insecto.

No existen receptores para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo tanto los humanos no son susceptibles a estas proteínas. Esto se ha confirmado en numerosos estudios de bioseguridad llevados a cabo en animales de laboratorio, que son tradicionalmente sustitutos experimentales de humanos. Los resultados de algunos de estos ensayos se han publicado en revisiones científicas (Ignoffo, 1973; Shaddock *et al.*, 1983; Siegel & Shaddock, 1989). Los resultados no publicados de los ensayos de bioseguridad generados por firmas que registraron las preparaciones comerciales de *B. thuringiensis*, han sido igualmente resumidas en los Estándares de Registro para Formulaciones de Bt de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (*Environmental Protection Agency*, EPA 1988). Una formulación típica está compuesta por esporas Bt y endotoxinas proteicas Bt, consistiendo estas últimas en hasta un tercio del peso de las esporas. Los insectos blanco son susceptibles a dosis orales de proteínas Bt, mientras que, por su parte, no existe evidencia de efecto tóxico alguno en mamíferos, peces o aves de laboratorio, a los que se les suministraron dosis equivalentes de hasta 10 µg de proteína por gramo de peso corporal. No se observaron efectos negativos en insectos no blanco con dosis más de 100 veces superior a la necesaria para controlar insectos plaga (EPA, 1988). Además de la falta de receptores para las proteínas Bt, la ausencia de efectos adversos en animales no blanco es mayor aún por la poca solubilidad y estabilidad de las proteínas Bt en el medio ácido del estómago. Las condiciones ácidas estomacales y la presencia de ácidos biliares desnaturalizan las proteínas Bt, facilitando su rápida degradación (EPA MRID no. 43439201). Las delta-endotoxinas activadas enzimáticamente *in vitro* resultan también no tóxicas cuando se administran oralmente a animales de laboratorio. Incluso si las toxinas proteicas Bt activadas pudieran ingresar al tracto digestivo de mamíferos, no existen receptores en la superficie del tejido gastrointestinal que permitan la adhesión de la toxina proteica a la superficie celular.

Estas consideraciones científicas demuestran el historial de uso seguro de las preparaciones de *B. thuringiensis*. Basándose en la información científica disponible, la EPA y otras instituciones científicas regulatorias en todo el mundo han determinado que el uso de productos de *B. thuringiensis* registrados no supone riesgos significativos para la salud humana u organismos no blanco.

Tabla 1. Endotoxinas Bt y sus actividades contra determinadas especies de insectos¹

Proteína Cry	Origen (subespecies Bt)	Insectos blanco principales	
		Orden ²	Nombres comunes
Cry1Aa	<i>kurstaki</i>	L	gusano de seda, polilla del tabaco, barrenador europeo del maíz
Cry1Ab	<i>berlineri</i>	L, D	polilla del tabaco, polilla del repollo, mosquito
Cry1Ac	<i>kurstaki</i>	L	gusano cogollero del tabaco, gusano falso medidor del repollo, isoca del algodón
Cry1Ad1	<i>aizawai</i>	L	varios lepidópteros
Cry1Ae1	<i>alesti</i>	L	gusano cogollero del tabaco
Cry1Ba1	<i>thuringiensis</i>	L	gusano del repollo
Cry1Bc2	<i>morrisoni</i>	L, D	varios lepidópteros
Cry1Ca3	<i>entomocidus</i>	L	oruga de la hoja del algodón, mosquito
Cry1Cb1	<i>galleriae</i>	L	oruga militar
Cry1Da1	<i>aizawai</i>	L	oruga militar, polilla del tabaco
Cry1E	<i>kenyae</i>	L	oruga de la hoja del algodón
CryEb1	<i>aizawai</i>	L	varios lepidópteros
CryFa	<i>aizawai</i>	L	barrenador europeo del maíz, oruga militar
Cry2Aa	<i>kurstaki</i>	L, D	lagarta peluda, mosquito
Cry2Ab	<i>kurstaki</i>	L	lagarta peluda, gusano falso medidor del repollo, polilla del tabaco
Cry2Ac	<i>shangai</i>	L	polilla del tabaco, lagarta peluda
Cry3Aa	<i>san diego</i>	C	escarabajo de la papa del Colorado
Cry3Aa3	<i>tenebrionis</i>	C	escarabajo de la papa del Colorado
CryBa	<i>tolworthi</i>	C	escarabajo de la papa del Colorado
Cry7Aa	N/D ³	C	escarabajo del pepino
Cry4Aa	<i>israelensis</i>	D	mosquito (Aedes y Culex)
CryBa	<i>israelensis</i>	D	mosquito (Aedes)
Cry9Aa	<i>galleriae</i>	L	polilla de la cera o falsa tiña
Cry9Ba	<i>galleriae</i>	L	polilla de la cera o falsa tiña

1. Adaptado de Krattiger (1997)

2. L: Lepidoptera; C: Coleoptera; D: Diptera

3. N/D: No disponible

Referencias

1. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982). Nucleotide Sequence and Exact Localization of the Neomycin Phosphotransferase Gene from Transposon Tn5. *Gene* 19, 327-336.
2. Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, D. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 807-813.
3. EPA (1988). Guidance for the registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as an active ingredient. NTIS PB 89-164198.
4. EPA MRID no. 43439201. Ream, J.E. (1994). Assessment of the In Vitro Digestive Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-I Protein., Study Number 93-01-39-04, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
5. Fischhoff, D.A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., McCormick, S.M., Niedermeyer, J.G., Dean, D.A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E.J., Rochester, D.E., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1987). Insect Tolerant Transgenic Tomato Plants. *Biotechnology* 5, 807-813.
6. Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffman, N.L. & Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 4801-4807.
7. Höfte, H. & Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Reviews* 53, 242-255.
8. Ignoffo, C.M. (1973). Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 217, 144-172.

9. Kay, R., Chan, A., Daly, M. & McPherson, J. (1985). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236, 1299-1302.
10. Kishore, G. & Shah, D. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 627-663.
11. Klee, H.J. & Rogers, S.G. (1987). Cloning of an Arabidopsis Gene Encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase: Sequence Analysis and Manipulation to Obtain Glyphosate-Tolerant Plants. *Mol. Gen. Genet.* 210, 437-442.
12. Krattiger, A.F. (1997). Insect resistance to crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. ISAAA Briefs No. 2. ISAAA: Ithaca, NY. pp. 42.
13. Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812.
14. Rochester, D.E., Winer, J.A. & Shah, D.M. (1986). The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO J.* 5, 451-458.
15. Shaddock, J.A. (1983). Some observations on the safety evaluation of nonviral microbial pesticides. *Bull. W.H.O.* 61, 117-128.
16. Siegel, J.P. & Shaddock, J.A (1989). Safety of microbial insecticides to vertebrates - humans. In: *Safety of Microbial Insecticides*, pp. 101-114. CRC Press, Inc., Florida, U.S.A.
17. Timko, M.P., Herdies, L., de Alameida, E., Cashmore, A.R., Leemans, J. & Kreffers, E. (1988). Genetic Engineering of Nuclear encoded Components of the Photosynthetic Apparatus of Arabidopsis In: *The Impact of Chemistry on Biotechnology - A Multidisciplinary Discussion*. ACS Books, Washington, DC. pp. 279-295.
18. Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of Single Stranded Plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 153, 3-11.
19. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13 mp18 and pUC19 Vectors. *Gene* 33, 103-119.



Capítulo 5- Método de transformación

Se requiere una descripción detallada de las características moleculares de la planta transgénica para demostrar que el obtentor ha analizado críticamente dicha planta y sus productos, incluyendo todos los genes y proteínas nuevas. El método por el cual se introduce la nueva característica en la planta receptora determina, en parte, los requerimientos de información para la evaluación de la biología molecular de la planta. Los dos métodos principales para introducir nuevo material genético en células vegetales son el bombardeo con micropartículas y la transformación mediada por *Agrobacterium*. Cada una de estas técnicas, descritas en mayor detalle a continuación, presenta cuestiones específicas que deben ser tratadas.

Transformación mediada por *Agrobacterium*

Agrobacterium es un microorganismo fitopatógeno del suelo que usa procesos de ingeniería genética para “dominar” parte de la maquinaria metabólica de la célula vegetal hospedadora, de modo de derivar algunas de las fuentes de carbono y nitrógeno de la célula hospedadora para la producción de nutrientes bacterianos (opinas), los cuales pueden ser catabolizados específicamente por la bacteria invasora (Tempe & Schell, 1977). Las células parasitadas son también inducidas a proliferar, y el tumor resultante en la enfermedad “agalla de la corona” es el resultado directo de la incorporación de una región del ADN transferido, ADN-T, derivado de un megaplásmido circular Ti (inductor de tumor, 150-250 kB) de *A. tumefaciens*, en el genoma de la planta hospedadora.

La comprensión de este proceso natural de transformación, junto con la idea de que cualquier porción de ADN foráneo colocada entre las secuencias borde del ADN-T puede ser transferida a células vegetales, llevó a la construcción del primer vector y sistema bacteriano de transformación vegetal (para una revisión bibliográfica ver Hooykaas & Shilperoort, 1992). Desde el primer informe de una planta transgénica de tabaco que expresaba genes foráneos (Fraleley *et al.*, 1983), se ha logrado un gran progreso en el conocimiento a nivel molecular del proceso de transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* infecta naturalmente sólo especies dicotiledóneas, aunque los métodos de transformación mediada por *Agrobacterium* también se han aplicado a plantas monocotiledóneas recientemente. Tal es el caso del arroz (Hiei *et al.* 1994; Cheng *et al.* 1998), banana (May *et al.*, 1995), maíz (Ishida *et al.*, 1996), trigo (Cheng *et al.*, 1997) y caña de azúcar (Enríquez-Obregón, 1997 y 1998; Arencibia *et al.*, 1998). Se ha publicado un análisis exhaustivo de las estrategias para la aplicación práctica de esta metodología (Birch, 1997).

La transformación de tejido vegetal mediada por *Agrobacterium* resulta generalmente en un bajo número de copias, mínimos rearrreglos, y una eficiencia de transformación superior a la obtenida por métodos de transformación directa, como el bombardeo con micropartículas (Pawlowski & Somers, 1996; Gelvin, 1998).

Hasta 1995 se pensaba que las secuencias comprendidas entre el borde izquierdo y derecho del ADN-T eran los únicos elementos transgénicos que se transferían a la célula receptora. Ramanathan y Veluthambi (1995), Wenk *et al.* (1997) y Kononov *et al.* (1997) demostraron que hay secuencias del vector por fuera de los bordes del ADN-T que también podían ser integradas junto con los genes de interés. Los ensayos de Kononov *et al.* (1997) demostraron que las secuencias plasmídicas podían integrarse al genoma receptor acopladas a las secuencias del borde izquierdo o derecho, o como una unidad independiente, no ligada al ADN-T. Matzke & Matzke (1998) establecieron que las secuencias plasmídicas que se unen al ADN-T y al ADN receptor parecen ser especialmente deletéreas para la expresión génica, y esta observación fue avalada por el hallazgo, por parte de los mismos autores, de que fragmentos plasmídicos separados del ADN-T se correlacionaban con transgenes expresados en forma estable.

Las plantas que se transforman en forma independiente con el mismo plásmido tendrán comúnmente diferentes niveles de expresión, un fenómeno que no siempre se correlaciona con el número de copias (Gelvin, 1998). En cambio, la expresión diferencial de los transgenes ha sido atribuida por algunos autores a “efectos posicionales”, donde la posición del sitio de integración del ADN-T en el genoma receptor afecta el nivel de expresión del transgén. Sin embargo, otras investigaciones han indicado que otros factores, además -o más allá- de la posición del sitio de integración, contribuyen al nivel de expresión del transgén (Gelvin, 1998). Esto es particularmente cierto para los arreglos variables que las secuencias transgénicas pueden sufrir en el genoma receptor.

El ADN-T se puede integrar en el genoma receptor en patrones alternativos al de copia única en un único sitio. También pueden ocurrir múltiples copias o repeticiones invertidas y otros patrones complejos. La presencia de insertos de ADN-T multiméricos, especialmente estructuras repetidas invertidas, se correlaciona fuertemente con el fenómeno de silenciamiento del transgén (Gelvin, 1998).

La expresión variable de los transgenes o el silenciamiento génico es un fenómeno ubicuo en las plantas transgénicas, así hayan sido producidas por métodos de transformación directa o mediada por *Agrobacterium*. El silenciamiento génico puede ser el resultado de las interacciones entre las múltiples copias del transgén y genes endógenos relacionados, y está asociado con mecanismos basados en homología de secuencia que actúan tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Matzke & Matzke, 1998). El silenciamiento que es resultado del impedimento de la iniciación de la transcripción está usualmente asociado a la metilación de las citosinas y/o a la condensación de la cromatina (Fagard & Vaucheret, 2000), mientras que el silenciamiento post-transcripcional (co-supresión) involucra una incrementada degradación del ARN en el citoplasma (Matzke & Matzke, 1998).

Una tercera categoría de silenciamiento ha sido propuesta para las consecuencias de los efectos posicionales, donde el ADN vegetal flanqueante y/o la localización cromosómica desfavorable ejercen un efecto de silenciamiento sobre el transgén (Matzke & Matzke, 1998). Acorde a Matzke & Matzke (1998), este tipo de silenciamiento refleja el estado epigenético de las secuencias endógenas flanqueantes al sitio de inserción o la tolerancia de regiones particulares del cromosoma para la inserción de ADN foráneo.

Bombardeo con micropartículas

El bombardeo con micropartículas (también conocido como biobalística o aceleración de partículas) es una técnica usada para hacer llegar ADN en forma directa al genoma receptor, y se comprobó que es útil para la transformación de especies recalcitrantes a la infección por *Agrobacterium*. En resumen, el ADN plasmídico o lineal con el/los gen/es de interés se fija a partículas de tungsteno u oro (micropartículas o *microcarriers*), las cuales son impulsadas hacia las células receptoras a alta velocidad para que logren penetrar en sus núcleos. Dentro del núcleo, el ADN se separa de la micropartícula y se integra al genoma receptor. El bombardeo con micropartículas se puede utilizar para transformar tejidos de la mayoría de las especies vegetales, sin embargo, comparado con *Agrobacterium* es relativamente ineficiente para producir células vegetales transformadas en forma estable.

La transformación de tejidos vegetales por biobalística da como resultado patrones de integración de los transgenes que generalmente muestran al transgén integrado en su longitud completa, rearreglos del transgén que difieren en tamaño con el inserto de longitud completa, concatenación ocasional del plásmido introducido que lleva el transgén, y variación en el número de copias entre los elementos transgénicos de longitud completa y parcial (Pawlowski & Somers, 1996). El número de copias del transgén puede variar desde 1 hasta 20. Las copias múltiples usualmente co-segregan como un *locus* transgénico, indicando que las secuencias se han integrado en *loci* cercanamente ligados o en un único *locus*, en vez de haberse integrado aleatoriamente a lo largo de todos los cromosomas (Pawlowski & Somers, 1996).

La caracterización molecular de las plantas transgénicas obtenidas por bombardeo con micropartículas ha evidenciado grandes rearreglos de las secuencias transgénicas (Pawlowski & Somers, 1996). Estos rearreglos pueden observarse en análisis de Southern blot como

fragmentos de hibridación de tamaño distinto al inserto de longitud completa. Los fragmentos mayores son indicativos de concatenación (en la misma dirección o en dirección invertida). Los concatémicos de insertos de ADN se pueden deducir al digerir al ADN genómico con una enzima de restricción que corte en un único sitio dentro del elemento transgénico. Así, se resolverán múltiples copias del inserto de ADN por Southern blot. Los concatémicos se pueden formar por recombinación homóloga del ADN transformado o por ligación de extremos romos obtenidos a partir de extremos cohesivos producidos por una actividad exonucleasa limitada (Folger *et al.*, 1982 y Rohan *et al.*, 1990 en Pawlowski & Somers, 1996). Los fragmentos menores al de longitud completa son evidencia de deleciones o truncamientos.

Los fragmentos de ADN transgénico mayores al de longitud completa también pueden ocasionarse por intercalación del ADN insertado con ADN del receptor. Powlowski y Somers (1998) informaron que cada una de las 13 líneas de avena transformadas usando bombardeo con micropartículas tenía copias intactas del transgén, además de fragmentos múltiples, rearrreglos y/o transgenes truncados. Los sitios de inserción variaron entre 2 y 12, y todos los fragmentos de ADN transgénico cosegregaron. Los autores determinaron que el ADN transgénico estaba intercalado con ADN genómico receptor/endógeno. Este mismo fenómeno también ha sido informado para arroz (Cooley *et al.*, 1995).

CASO DE ESTUDIO MON810

Descripción del método de transformación

El ADN plasmídico se introdujo por el método de aceleración de partículas de Klein *et al.* (1987) en la línea Hi-II de maíz, derivada de las líneas endocriadas A188 y B73 (Armstrong *et al.*, 1991). Estas son líneas endocriadas públicas desarrolladas en EE.UU. por la Universidad de Minnesota y la Universidad Estatal de Iowa, respectivamente. El ADN plasmídico se precipitó sobre micropartículas de tungsteno u oro usando cloruro de calcio y espermidina. Una gota de las partículas recubiertas fue colocada sobre un proyectil (*macrocarrier*) plástico, el cual fue acelerado a alta velocidad a través del cañón de aceleración por la fuerza explosiva de una descarga de pólvora. Las células vegetales blanco fueron incubadas en un medio de cultivo de tejidos suplementado con 2,4-D para permitir el desarrollo de callos.

A pesar de que la solución de ADN utilizada para la transformación contenía genes codificantes para la tolerancia a glifosato (genes *cp4 epsps* y *gox*), que permiten la selección de las células transformadas en medios de cultivo adicionados con glifosato, estos genes no están presentes en las plantas MON810. La célula que dio origen a la línea MON810 fue probablemente un escape a la selección con glifosato. Las células en el entorno a la que originó MON810 pudieron haber degradado el glifosato disponible, permitiendo que la célula en cuestión sobreviviera. Las plantas fueron subsecuentemente regeneradas a partir de tejido de callo en ausencia de glifosato y fueron evaluadas para determinar la expresión de la proteína Cry1Ab.

La construcción

La línea MON810 de maíz se obtuvo transformando el genotipo Hi-II de maíz con una solución de ADN que contenía dos plásmidos, PV-ZMBKO7 y PV-ZMGTI0. El plásmido PV-ZMBKO7 contiene el gen *cry1Ab* y el plásmido PV-ZMGTI0 contiene los genes *cp4 epsps* y *gox*. Ambos plásmidos contienen el gen *nptII* bajo el control de un promotor bacteriano necesario para la selección de las bacterias que contengan cualquiera de los dos plásmidos, y un origen de replicación del plásmido pUC (ori-pUC) necesario para la replicación del plásmido dentro de la bacteria. Una descripción de los elementos de ADN incluidos en PV-ZMBKO7 se encuentra en la Tabla 1. Aunque también se proveen los detalles del vector PV-ZMGTI0, ninguna de las secuencias de ADN provenientes de dicho vector están presentes en MON810.

Tabla 1. Resumen de los elementos genéticos del plásmido PV-ZMBK07

Elemento genético	Tamaño (kb)	Función
E35S	0,61	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell et al 1985) con la región potenciadora (enhancer) duplicada (Kay et al 1985)
intron <i>hsp70</i>	0,80	Intrón del gen <i>hsp70</i> (proteína de choque térmico) del maíz para aumentar los niveles de transcripción (Rochester et al 1986)
<i>Cry1Ab</i>	3,46	Gen que codifica la proteína Cry1Ab idéntica a la natural (Fischloff et al 1987)
NOS 3'	0,26	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa que termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley et al 1983)
<i>lacZ</i>	0,24	Una secuencia codificante parcial del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , el promotor <i>P_{lac}</i> y la secuencia codificante parcial de la proteína beta galactosidasa de pUC119 (Yanisch-Perron et al 1985)
ori-pUC	0,65	Origen de replicación para el plásmido pUC que permite la replicación en <i>E. coli</i> (Vieira & Messing 1987)
<i>nptII</i>	0,79	Gen de la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II. Confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos y así permite la selección de bacterias que contienen el plásmido (Beck et al 1982)

Vector PV-ZMBK07 de expresión en planta: El vector plasmídico PV-ZMBK07 (7,794 pb; Fig. 1) contiene el gen *cry1Ab* proveniente de *B. thuringiensis* bajo el control del promotor potenciado del transcripto 35S del CaMV (*E35S*) (Kay et al., 1985; Odell et al., 1985), de aproximadamente 0,6 kb. Localizado entre el promotor *E35S* y el gen *cry1Ab*, se encuentra el intrón de 0,8 kb del gen *hsp70* (*heat shock protein*) de maíz, incluido para incrementar los niveles de transcripción del gen (Rochester et al., 1986). El intrón *hsp70* se encuentra seguido por el gen *cry1Ab* de 3,47 kb (Fischhoff et al. 1987). El gen *cry1Ab* está unido a la secuencia 3' no traducible de 0,27 kb del gen *nopalina sintasa*, 3' nos (Fraley et al., 1983), la cual provee la señal de poliadenilación del ARNm.

El gen *cry1Ab* tiene una longitud de 3.468 nucleótidos y codifica para la proteína Cry1Ab [B-t-k. HD-1] completa de 1156 aminoácidos (Fischhoff et al., 1987), la cual, al ser sometida a tripsina, da como producto una proteína activa resistente a tripsina de aproximadamente 600 aminoácidos en planta e *in vitro* (EPA MRID no. 43533203). La secuencia del gen *cry1Ab* fue modificada para aumentar los niveles de expresión en maíz (Perlak et al., 1991). El gen *cry1Ab* en la línea MON810 de maíz codifica para la proteína Cry1Ab idéntica a la de la naturaleza (Fischhoff et al. 1987). La secuencia aminoacídica deducida para la proteína Cry1Ab se encuentra en la Fig. 2.

La región alfa del gen *lacZ*, que codifica para la enzima beta-galactosidasa, se encuentra presente en el plásmido PV-ZMBK07 bajo el control de un promotor bacteriano. Esta región contiene un sitio de múltiple clonado (*polylinker*) que permite el clonado de los genes deseados dentro del vector (Vieira y Messing, 1987). La región alfa del gen *lacZ* está seguida por un origen de replicación plasmídico de 0,65 kb funcional en *E. coli* (Vieira y Messing, 1987).

A continuación de la región ori-pUC se encuentra el gen que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (*nptII*). Esta enzima confiere resistencia contra antibióticos aminoglicósidos (por ej.: kanamicina y neomicina) y fue utilizado para la selección de bacterias transformadas durante la etapa de construcción del plásmido. La secuencia codificante del gen *nptII* deriva del transposón procariota Tn5 (Beck et al., 1982) y se encuentra bajo su propio promotor bacteriano.

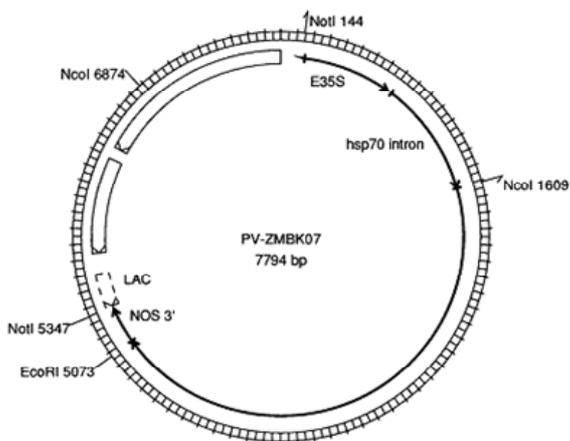


Fig. 1. Mapa del plásmido PV-ZMBK07. Se muestran los sitios de restricción (y sus localizaciones en pares de bases) usados en el análisis de Southern blot

1	MDNNPNINEC	IPYNCLSNPE	VEVLGGERIE	TGYTPIDISL	SLTQFLLEF
51	VPGAGFVLGL	VDIIWGFIFG	SQWDAFLVQI	EQLINQRIEE	FARNQAISSL
101	EGLSNLYQIY	AESFREWEAD	PTNPALREEM	RIQFNDMNNSA	LTTAIFLFAV
151	QNYQVPLLSV	YVQAANLHLS	VLRDVSFVFG	RWGFDAATIN	SRYNDLTRLI
201	GNYTDHAVRW	YNTGLERVWG	PDSRDWIRYN	QFRRELTLTV	LDIVSLFPNY
251	DSRTYPIRTV	SQLTREIYTN	PVLENFDGSF	RGSAAQIEGS	IRSPHLMNIL
301	NSITIYTDH	RGEYYWSGHQ	IMASPVGFSG	PEFTFPLYGT	MGNAAPQQRI
351	VAQLGQGVYR	TLSSSTLYRRP	FNIGINNQQL	SVLDTGTEFAY	GTSSNLPSAV
401	YRKSQTVDSL	DEIPPQNNV	PPRQGFSHRL	SHVSMFRSGF	SNSSVSIIRA
451	PMFSWIHRSA	EFNNIIPSSQ	ITQIPLTKST	NLGSQTSVVK	GPFTGGDIL
501	RRTSPGQIST	LRVNIPTAPLS	QRYRVIRIYA	STTNLQFHTS	IDGRPINQGN
551	FSATMSSGSN	LQSGSFRTVG	PTTFFNFNSG	SSVFTLSAHV	FNSGNEVYID
601	RIEFVPAEVT	FEAEYDLERA	QKAVNELFTS	SNQIGLTKDV	TDYHIDQVSN
651	LVECLSDFC	LDEKKELSEK	VKHAKRLSDE	RNLLQDPNFR	GINRLDRGW
701	RGSTDITIQG	GDDVFKENYV	TLLGTFDECY	PTYLYQKIDE	SKLKAYTRYQ
751	LRGYIEDSQD	LEIYLIRYNA	KHETVNVPGT	GSLWPLSAPS	PIGKCAHSH
801	HFSLDIDVGC	TDLNEDLGWV	VIFKIKTDQG	HERLGNLEFL	EGRAPLVGEA
851	LARVKRAEKK	WRDKREKLEW	ETNIVYKEAK	ESVDALFVNS	QYDRLQADTN
901	IAMIHAADKR	VHSIREAYLP	ELSVIPGVNA	AIFEELEGRI	FTAFSLYDAR
951	NVIRKNGDFN	GLSCWNVKGH	VDVEEQNNHR	SVLVVPWEA	EVSQEVRCPC
1001	GRGYILRVTA	YKEGYGEGCV	TIIHEIENNTD	ELKFSNCVEE	EYVPNNTVTC
1051	NDYTATQEEY	EGTYTSRNRG	YDGAYESNSS	VPADYASAYE	EKAYTDGRDR
1101	NPCESTRGYG	DYTPLPAGYV	TKELEYFPET	DKVWIEIGET	EGTFIVDSVE
1151	LLLMEE				

Fig. 2. Secuencia de aminoácidos deducida de la proteína Cry1Ab.

Vector PV-ZMG10 de expresión en planta: Esta descripción de las funciones de las secuencias contenidas en PV-ZMG10 es netamente informativa, ya que ninguna de las secuencias génicas de este vector se ha detectado en MON810. El plásmido PV-ZMG10 contiene los genes *gox* y *cp4 epsps* fusionados a los péptidos señal de tránsito a cloroplasto *ctp1* y *ctp2*, respectivamente. Ambas regiones codificantes se encuentran bajo el control del promotor 35S potenciado, el intrón de *hsp70* de maíz y la secuencia terminadora 3' *nos*. El vector PV-ZMG10 contiene las mismas regiones alfa *lacZ*, *ori-pUC* y *nptII* descritas para PV-ZMBK07.

El gen *cp4 epsps* fue aislado de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 (Barry *et al.*, 1992) y se ha demostrado que tiene el potencial de otorgar alta resistencia a la inhibición por glifosato cuando se lo introduce en plantas (Padgett *et al.* 1993). El glifosato se une y bloquea la actividad de su enzima blanco, EPSPS, una enzima de la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. La proteína CP4 EPSPS representa una de las tantas formas distintas de proteína EPSPS que se encuentran en la naturaleza (Schuls *et al.*, 1985). CP4 EPSPS es altamente tolerante a la inhibición por glifosato y tiene una alta eficiencia catalítica, comparada con la mayoría de las proteínas EPSPS (Barry *et al.*, 1992; Padgett *et al.*, 1993). Las células vegetales que expresan la proteína CP4 EPSPS son tolerantes al glifosato cuando se encuentra presente en los medios de crecimiento, ya que la acción continua de la enzima CP4 EPSPS logra cumplir la función necesaria para la síntesis de los aminoácidos aromáticos. El gen *cp4 epsps* no se encuentra presente en la línea MON810.

El gen *cp4 epsps* presente en PV-ZMG10 contiene un péptido de tránsito a cloroplasto, *ctp2*, aislado del gen *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Klee & Rogers, 1987), el cual dirige a la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, que es la localización de la proteína EPSPS en las plantas y el sitio de la síntesis de los aminoácidos aromáticos (Kishore and Shah, 1988). El gen *cp4 epsps* con su *ctp2* tiene una longitud aproximada de 1,7 kb. El casete del gen *cp4 epsps* (promotor hasta secuencia de terminación 3') está unido al casete *gox*.

El gen *gox*, que codifica para la enzima glifosato oxidoreductasa (GOX) que metaboliza al glifosato, fue clonado a partir de *Achromobacter* sp. (nuevo género *Ochrobactrum anthropi*) cepa LBAA (Hallas *et al.*, 1988; Barry *et al.*, 1992; Barry *et al.*, 1994). La proteína GOX se dirige a los plástidos con un péptido señal de tránsito a cloroplasto, *ctp1*. La secuencia *ctp1* deriva del gen que codifica para la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (*ssu1a*) de

Arabidopsis thaliana (Timko *et al.*, 1988). La enzima GOX degrada el glifosato convirtiéndolo en ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glioxilato (Padgett *et al.*, 1994). El gen *gox* no se encuentra en la línea MON810.

Referencias

1. Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Tellez, P., Chan, M.T. Yu, S.M., Trujillo, L.E. & Oramas, P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* **7**, 1-10.
2. Armstrong, C.L., Green, C.E. & Phillips, R.L. (1991). Development and availability of germplasm with High Type II culture formation response. *Maize Genetics Corporation Newsletter* **65**, 92-93.
3. Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K. & Hallas, L. (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. pp. 139 - 145. In: *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. Singh *et al.* (eds.). American Society of Plant Physiologists.
4. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**, 327-336.
5. Birch, R.G. (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 297-326.
6. Cheng, M, Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. & Wan, Y.C. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**, 971-980.
7. Cheng, XY, Sardana, R., Kaplan, H. & Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci.* **95**, 2767-2772.
8. Cooley, J., Ford, T. & Christou, P. (1995). Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 97-104.
9. Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-padrón, R.I., Prieto-sansonov, D.L., de la Riva, G.A. & Selman-Housein, G. (1998). Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* **206**, 20-27.
10. Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Samsónov, D.L., Pérez, M. & Selman-Housein, G. (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. *Biotecnología Aplicada* **14**, 169-174.
11. EPA MRID no. 43533203. Lee, T.C., Bailey, M. & Sanders, P.R. .Compositional Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Protein Produced in ECB Resistant Corn and the Commercial Microbial Product, DIPEIXY., Study Number 94-01-39-12, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
12. Fagard, M. & Vaucheret, H. (2000). (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 167-194.
13. Fischhoff, D. A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., McCormick, S.M., Niedermeyer, J.G., Dean, D.A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E.J., Rochester, D.E., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* **5**, 807-813.
14. Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. & Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 4803-4807.
15. Gelvin, S.B. (1998). The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 227-232
16. Hallas, L. E., Hahn, E. M. & Komdorfer, C. (1988). Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. *J. Industrial Microbiol.* **3**, 377-385.
17. Harrison, L.A., Bailey, M.R., Leirngruber, R.M., Smith, C.E., Nida, D.L., Taylor, M.L., Gustafson, M., Heeren, B. & Padgett, S.R. (1993). Characterization of microbially-expressed protein: CP4 EPSPS. Study Number 92-01-30-14, MSL-12901, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MWD no. 43643301.
18. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oriza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* **6**, 271-282.

19. Hooykaas, P.J.J. & Shilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **19**, 15-38.
20. Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. & Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* **4**, 745-750.
21. Kay, R., Chan, A., Daly, M. & McPherson, J. (1985). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299-1302.
22. Kishore, G. & Shah, D. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 627-663.
23. Klee, H. J. & Rogers, S. G. (1987). Cloning of an Arabidopsis gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 437-442.
24. Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. & Sanford, J.C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids in living cells. *Nature* **327**, 70-73.
25. Kononov, M.E., Bassuner, B. & Gelvin, S.B. (1997). Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant Journal* **11**, 945-957.
26. Matzke, A.J.M. & Matzke, M.A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 142-148.
27. May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. & Arntzen, C.J. (1995). Generations of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* **13**, 486-492.
28. Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.
29. Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L. & Fischhoff, D.A. (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 3324-3328.
30. Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology* **6**, 17-30.
31. Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12106-12110.
32. Ramanathan, V. & Veluthambi, K. (1995). Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Molecular Biology* **28**, 1149-1154.
33. Rochester, D.E., Winer, J.A. & Shah, D.M. (1986). The structure and expression of maize genes encoding major heat shock protein hsp70. *EMBO J.* **5**, 451-458.
34. Schulz, A., Kruper, A. & Amrhein, N. (1985). Differential sensitivity of bacterial 5 enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiology Letters* **28**, 297-301.
35. Tempe, J. & Schell, J. In: Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides, A.B. Legocki, Ed. (Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 1977) p.416.
36. Timko, M. P., Herdies, L., de Alarneida, E., Cashmore, A.R., Leemans, J. & Kreffers, E. (1988). Genetic engineering of nuclear-encoded components of the photosynthetic apparatus of Arabidopsis. In: The Impact of Chemistry on Biotechnology – A Multidisciplinary Discussion. ACS Books, Washington, DC. pp. 279-295.
37. Viera, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
38. Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. & Marton, L. (1997). Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology* **34**, 913-922.
39. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 Vectors. *Gene* **33**, 103-119.



Capítulo 6 – Caracterización molecular del ADN insertado

Es necesaria una descripción detallada de las características moleculares de la planta modificada para demostrar que el obtentor ha analizado críticamente la planta y sus productos, incluyendo todos los genes y proteínas nuevas. Se usa la caracterización de una planta transgénica a nivel molecular para proveer información acerca de: la composición e integridad del ADN insertado; el número de copias del ADN insertado; el número de sitios de inserción; y el nivel de expresión de la(s) nueva(s) proteína(s) a lo largo del tiempo y en los diferentes tejidos. El conocimiento de los genes introducidos, o modificados, su regulación y el sitio de integración dentro del genoma receptor en el caso de las plantas transgénicas, puede brindar información sobre posibles consecuencias directas e indirectas de la modificación genética.

Por ejemplo, el potencial de que resulten efectos adversos debido a la activación o inactivación producidas por la inserción, puede evaluarse caracterizando el ADN receptor adyacente y evitando aquellos productos que contengan transgenes en la proximidad de genes endógenos que se sabe que afectan la producción de compuestos alergénicos o tóxicos potenciales. Por otro lado, la caracterización molecular de plantas transgénicas usualmente recibe una cantidad desproporcionada de atención por parte de los reguladores en relación a la información que imparte en términos de alimento humano, animal o seguridad ambiental. En parte, la razón de esto puede ser que la información generada a partir de los análisis moleculares es normalmente menos abierta a interpretaciones que la información suministrada para responder preguntas acerca de, por ejemplo, el impacto de una planta transgénica sobre la biodiversidad.

Mientras que la información sobre la integridad y el número de copias del ADN insertado es requerida normalmente por las autoridades regulatorias, no existe evidencia que sugiera que las plantas transgénicas que contienen múltiples copias del ADN insertado son menos “seguras” que las plantas similares que contienen sólo una única copia. Un ejemplo de un evento aprobado que contiene un alto número de copias lo representa una línea de canola (*Brassica napus*, evento 23-198, 23-18), la cual fue desarrollada introduciendo un gen codificante de tioesterasa proveniente del laurel californiano (*Umbellularia californica*) para aumentar los niveles de ácido láurico (12:0) y, en menor medida, ácido mirístico (14:0). Se estimó que el evento de transformación original 23 contenía 15 copias de los genes, en cinco loci genéticos independientes, tal como lo demostraron los análisis de Southern blot y de segregación.

Resulta importante enfatizar que, si bien es necesaria, la caracterización molecular del ADN introducido (o modificado) no es un medio suficiente para predecir posibles consecuencias imprevistas ni es un sustituto para las determinaciones directas de la expresión génica o cambios en el nivel de nutrientes y antinutrientes, tóxicos endógenos o posibles alérgenos.

Debido a su método de obtención, las plantas transgénicas resultan más sencillas para caracterizar genética y molecularmente en forma exhaustiva que otra planta obtenida por otros métodos de mejoramiento. En este sentido, es importante distinguir entre “**necesidad de conocer**” y “**curiosidad por conocer**” en el contexto de evaluación de seguridad. Este tema es de particular relevancia en Canadá, donde la regulación de alimentos nuevos y plantas con nuevas características incluye productos obtenidos por métodos de mejoramiento tradicional de los cuales no es factible suministrar información molecular detallada. En estos últimos ejemplos, resulta difícil argumentar que la evaluación de seguridad se haya visto afectada como consecuencia de una incompleta información sobre secuencias de ADN. En resumen, cuando se sigue un enfoque basado en el producto para la regulación y evaluación de riesgos, debería haber un estándar de evidencia comparable para la seguridad de los productos regulados en forma similar dado que éstos presentan riesgos equivalentes.

CASO DE ESTUDIO MON810

Materiales y Métodos

Purificación de ADN: El ADN de las líneas MON810 y control MON818 fue purificado de tejido foliar joven proveniente de plantas crecidas en invernadero a partir de semillas cosechadas de ensayos a campo (Sanders & Patzer, 1995). Las hojas jóvenes fueron retiradas de las plantas de ensayo, molidas en nitrógeno líquido, y mezcladas con aproximadamente 6 ml de solución tamponada (*buffer*) CTAB precalentada a 65°C [2.6%(p:p) sorbitol, 0.22 M Tris pH 8, 21 mM EDTA, 0.8 M NaCl, 22 mM CTAB, y 1% (p/v) N-laurilsarcosina]. Las muestras fueron incubadas 30 minutos a 60°C con inversión frecuente. Luego se separó por centrifugación, se extrajo el sobrenadante con fenol:cloroformo (1:1 v/v), cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se lo precipitó con isopropanol. Los precipitados de ADN se lavaron con etanol 70%, se secaron por vacío, y se resuspendieron en TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). El ADN fue tratado con RNasa, cuantificado y conservado a aprox. 4°C.

Se usaron aproximadamente 10-15 µg del ADN purificado de las líneas control y MON810 para la digestión con enzimas de restricción. El ADN plasmídico de PV-ZMBK07 y PV-ZMG TIO fue utilizado como estándares de referencia. Las digestiones fueron realizadas con enzimas de restricción adquiridas a la firma Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN).

Preparación de la sonda de ADN: Se prepararon sondas homólogas a las regiones genéticas *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *gox*, *nptII*, y *ori-pUC* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o a partir de ADN plasmídico de PV-ZMBK07 y PV-ZMG TIO usando digestión con enzimas de restricción, separación en gel de agarosa y purificación (Gene Clean Kit, Bio 101, Vista, CA o QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Chatsworth, CA). Todas las sondas fueron marcadas radiactivamente con ³²P usando el método de cebadores al azar (*random priming*) (Prime-It® II Random Priming Kit, Stratagene, La Jolla, CA).

Análisis de Southern blot: Las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa. Además de las muestras de ADN, dos marcadores de peso molecular (MPM) se mezclaron y corrieron en el gel y se agujerearon los sitios correspondientes a sus respectivas bandas. Luego de la transferencia, los agujeros fueron marcados con puntos de tinta indeleble y posteriormente con tinta marcada con ³⁵S, transfiriendo efectivamente los estándares de peso correcto. La calle que contenía las marcas de los MPM no fue incluida en las figuras. El ADN del gel de agarosa fue transferido en *buffer* SSC 20X a una membrana de nylon Hybond-N^R (Amersham, Arlington Heights, IL) usando un Turboblotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH). El ADN fue unido covalentemente a la membrana con un Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA). La membrana con el ADN transferido fue prehibridizada en 0,5 M Na₂HPO₄•7H₂O, 7% SDS, hibridizada con la sonda marcada radiactivamente durante 14-16 horas a aprox. 65°C y luego lavada con 40 mM Na₂HPO₄•7H₂O. Los tiempos usuales de exposición fueron 1-3 días.

Resultados

El ADN de las plantas MON810 fue digerido con una variedad de enzimas de restricción y sometido a análisis de Southern blot para caracterizar el ADN que fue transferido al genoma del maíz durante el proceso de transformación. Específicamente, se examinó el número de insertos (número de sitios de integración dentro del genoma de maíz) y el número de copias e integridad de cada gen. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen del análisis de Southern blot del ADN genómico de MON 810

Elemento genético	Maíz MON810
<i>cry1Ab</i>	1 copia
gen CP4 EPSPS	ausente
<i>gox</i>	ausente
<i>nptII</i> – ori pUC	ausente

Número de insertos: Para determinar el número de insertos de ADN plasmídico en la línea MON810 de maíz, el ADN genómico se digirió con la enzima de restricción Nde I. Como los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 no contienen sitio de restricción para Nde I, esta enzima corta efectivamente por fuera de cualquier inserto, liberando un fragmento que contiene el ADN insertado más ADN genómico adyacente. El ADN de las líneas transgénica MON810 y control MON818 fue digerido con Nde I e hibridado con el ADN del plásmido PV-ZMBK07 como sonda. Los resultados se muestran en la Fig. 1. El ADN de MON818 (calle 1) produjo una banda muy tenue y difusa de aprox. 21,0 kb, la cual se asumió que era inespecífica, ya que está presente en el ADN de ambas líneas, MON818 y MON810. El ADN de MON810 produjo una banda de aprox. 5,5 kb (calle 2). Este resultado estableció que la línea de maíz MON810 protegida contra insectos contiene un fragmento de ADN integrado.

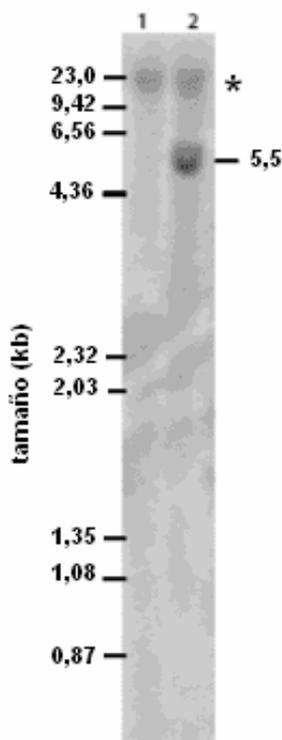


Fig.1. Análisis por Southern blot del ADN de MON 810. Los ADN genómicos del control MON 818 (calle 1) y del transgénico MON 810 (calle 2) se digirieron con *Nde*I e hibridaron con un fragmento de restricción marcado con 32 P del plásmido PV-ZMBK07. Se indican los marcadores de peso molecular. El símbolo (*) señala bandas inespecíficas (ruido de fondo).

Composición del inserto

Integridad del gen *cry1Ab*: El ADN de MON818 y MON810 digerido con *Nco*I/*Eco*RI fue hibridado con una sonda del gen *cry1Ab*. Estos resultados se muestran en la Fig. 2, calles 1-3. El control positivo de hibridización produjo un único fragmento de 3,46 kb, correspondiente al tamaño esperado del gen *cry1Ab*. El ADN plasmídico no fue mezclado con el ADN de MON818, por ello es que la banda parece mayor que su verdadero peso molecular. El ADN de MON818 (calle 2) no produjo ninguna banda, como era de esperar para esta línea control. El ADN de MON810 (calle 3) produjo una única banda de aproximadamente 3,1 kb.

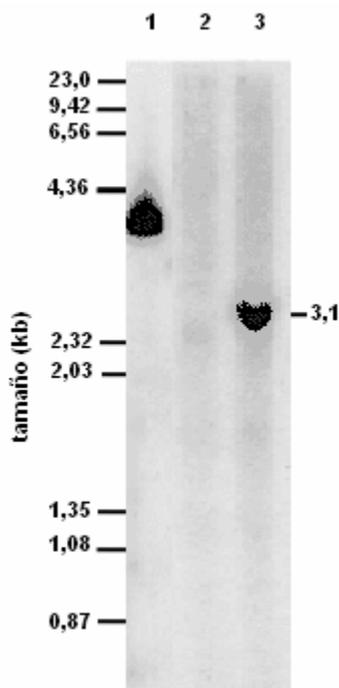


Fig. 2. Análisis por Southern blot del plásmido PV-ZMBK07 (calle 1), del ADN genómico del control MON818 (calle 2), o del transgénico MON810 (calle 3), digeridos con *Nco*I y *Eco*RI e hibridizados con una sonda marcada con ³²P específica para el gen *cry1Ab*.

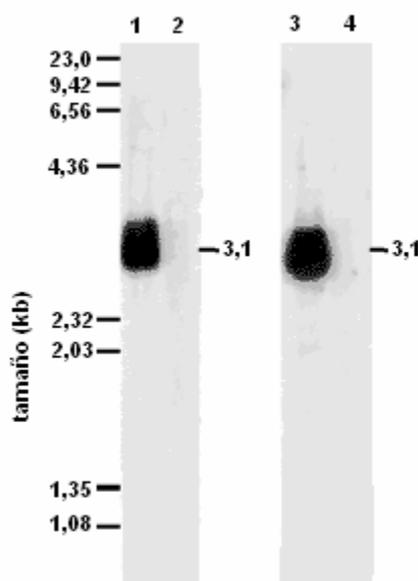


Fig. 3. Análisis por Southern blot de una mezcla de los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calles 1 y 3) y del ADN genómico de MON810 (calles 2 y 4), digeridos con *Nco*I y *Bam*HI e hibridado con una sonda marcada con ³²P específica para el gen CP4 EPSPS (calles 1 y 2) o *gox* (calles 3 y 4).

Integridad del gen *cp4 epsps*: El ADN de los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 y el ADN genómico de MON810 fueron digeridos con *Nco*I/*Bam*HI e hibridados con una sonda del gen *cp4 epsps*. Los resultados se muestran en la Fig. 3, calles 1 y 2. Aproximadamente 50 pg de una mezcla de ADN de PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calle 1) produjo una banda de tamaño aproximado a 3,1 kb, lo cual corresponde al tamaño esperado para el fragmento *cp4 epsps* como se predice a partir del mapa del plásmido PV-ZMGT10 (Fig. 3). El ADN de MON810 (calle 2) no mostró señal de hibridización con la sonda *cp4 epsps*, permitiendo establecer que MON810 no contiene el gen *cp4 epsps*.

Integridad del gen *gox*: El ADN de los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 y el ADN genómico de MON810 fueron digeridos con *Nco*I/*Bam*HI e hibridados con una sonda del gen *gox*. Los resultados se muestran en la Fig. 3, calles 3 y 4. Aproximadamente 50 pg de una mezcla de ADN de PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calle 3) produjo una banda, un fragmento *Nco*I/*Nco*I de aproximadamente 3,1 kb, que corresponde al tamaño esperado para el fragmento *gox* como se predice a partir del mapa del plásmido. El ADN de MON810 (calle 4) no mostró señal de hibridación con la sonda *gox*, permitiendo establecer que MON810 no contiene el gen *gox*.

Integridad del resto del plásmido vector: Los ADN del plásmido PV-ZMBK07, de la línea control MON818, y de MON810, fueron digeridos con *Nco*I/*Eco*RI para liberar la secuencia del vector *nptII/ori-pUC* y luego se hibridizó con el gen *nptII* como sonda. Los resultados se muestran en la Fig. 4 (calles 1-3). Aproximadamente 50 pg de ADN de PV-ZMBK07 produjeron dos bandas de 2,5 y 1,8 kb (calle 1). Dichas bandas corresponden al tamaño esperado para las secuencias del vector PV-ZMBK07. El ADN de MON818 solo (calle 2) no produjo banda alguna, como se esperaba para la línea control no transformada. El ADN de MON810 (calle 3) no mostró bandas, permitiendo establecer que no se integraron secuencias del vector al genoma de MON810. El Southern blot *Nco*I/*Eco*RI fue enjuagado y vuelto a hibridar con una sonda correspondiente a la región genética de *ori-pUC*. El ADN combinado de PV-ZMBK07/PV-

ZMGT10 (calle 4) produjo una banda de 1,8 kb, correspondiente al tamaño esperado para el vector PV-ZMBK07. El ADN de MON818 solo (calle 5) no produjo banda alguna, como se esperaba para la línea control no transformada. El ADN de MON810 (calle 3) no hibridó con la sonda ori-pUC, permitiendo establecer que no se integraron secuencias del vector al genoma de MON810.

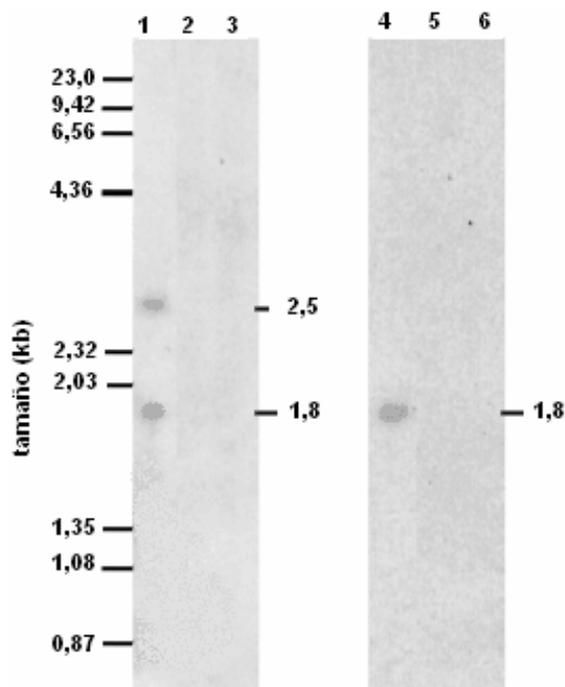


Fig. 4. Análisis por Southern blot del plásmido PV-ZMBK07 (calles 1 y 4), del ADN genómico del control MON 818 (calles 2 y 5) o del transgénico MON 810 (calles 3 y 6), digeridos con *Nco*I y *Eco*RI e hibridados con una sonda marcada con ³²P específica para la región *nptII* (calles 1-3) u *ori-pUC* (calles 4-6).

Conclusiones

La línea de maíz MON810 se obtuvo por la tecnología de aceleración de partículas con una solución de ADN que contenía los genes *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *gox* y *nptII*. La línea de maíz MON810 tiene una única copia de ADN integrado contenida en un fragmento de restricción con *Nde* I de aprox. 5,5 kb, el cual contiene el promotor *E35S*, el intrón *hsp70* de maíz y el gen *cry1Ab*.

Referencias

1. Sanders, P.R. & Patzer, S.S. (1995). Compositional analyses of MON801 grain and silage from the 1993 and 1994 corn field trials. Study Number 94-01-39-08, an unpublished study conducted by Monsanto Company.

Capítulo 7 – Estabilidad genética de la característica introducida



Se debe determinar la estabilidad y herencia de cada una de las características introducidas y que sean funcionales en la planta transformada. Para cada característica nueva, además del patrón y la estabilidad de la herencia, también debe demostrarse su nivel de expresión.

Generalmente se utilizan técnicas serológicas para medir la expresión de la característica tanto cualitativamente (por ej., Western blot, ELISA, etc.) como cuantitativamente (por ej., ELISA, radioinmunoensayos, etc). Si la característica nueva es de las que no producen como resultado una proteína nueva o modificada (por ej., plantas transgénicas que contienen secuencias antisentido insertadas, como el tomate Flavr Savr® que contiene una secuencia antisentido correspondiente al gen que codifica para la enzima poligalacturonasa), entonces su patrón de herencia deberá determinarse examinando directamente el ADN insertado o midiendo la producción del ARN transcrito.

CASO DE ESTUDIO MON810

Análisis de segregación de MON810

En la Tabla 1 se presentan los datos de segregación de las plantas BC0F1 (derivadas de la cruce de R0 con una línea endocriada), BC1F1 (derivadas de la cruce de BC0F con la misma línea endocriada usada para cruzar con las plantas R0), y BC1F2 (derivadas de la cruce de plantas BC0FB individuales con una planta de prueba no transgénica y del posterior análisis de las generaciones subsiguientes por el sistema “espiga por surco” (ear to row). Los resultados son consistentes con un único inserto activo que segrega según la genética mendeliana.

Tabla 1. Datos y análisis segregacional de la progenie del maíz MON 810.

Generación	Real	Esperado	Chi cuad.
BC0F1 ¹	44:47	45,5:45,5	0,044*
BC1F1 ²	10:4	7:7	1,786*
BC1F2 progenie ³	69:181:77	81,75:163,5:81,75	4,138**

1. Los datos se presentan como el número de plantas que expresan la proteína:plantas que no la expresan, basados en ensayos de alimentación en barrenador europeo del maíz.

2. Los datos se presentan como el número de plantas que expresan la proteína:plantas que no la expresan, basados en ensayos de ELISA para Cry1Ab.

3. Los datos se presentan como el número de hileras en la espiga con plantas homocigotas para la expresión:número de hileras en la espiga con plantas segregantes:número de hileras en la espiga con plantas homocigotas susceptibles, basados en el ensayo de alimentación en barrenador europeo del maíz.

*No significativo, $p=0,05$ (Chi cuad 3,84, 1 grado de libertad)

**No significativo, $p=0,05$ (Chi cuad 5,99, 2 grados de libertad)

El gen *cry1Ab* en la línea de maíz MON810 demostró ser estable a través de siete generaciones de cruzamientos con un parental recurrente (B73) y seis generaciones de cruzamientos con una segunda línea endocriada no relacionada (Mo17) (Tabla 2). Las pruebas estadísticas de chi cuadrado para las retrocruzas con B73 y con Mo17 no mostraron desviaciones con respecto a los valores esperados con un valor $p = 0,05$.

Tabla 2. Estabilidad de la transferencia génica basada en los datos de segregación para los derivados de las retrocruzas de MON 810 en dos líneas híbridas no relacionadas (B73, Mo17).

Generación	Real	Esperado	Chi cuad
BC6F1(B73) ¹	8:13	10,5:10,5	0,762*
BC5F1(Mo17) ¹	11:11	11:11	0,045*

1. Los datos se presentan como el número de plantas que expresan la proteína:número de plantas que no la expresan, basados en el ELISA para Cry1Ab. *No significativo, $p=0,05$ (chi cuad=3,84, 1 grado de libertad).

Conclusión

Los datos de segregación y estabilidad (Tablas 1 y 2) son consistentes con un único sitio activo de inserción para el gen *cry1Ab* en el ADN genómico de la línea MON810 de maíz. La estabilidad de esta inserción se ha demostrado a través de siete generaciones de cruzamientos.

Estabilidad del integrón

Con el fin de demostrar la integración estable del gen *cry1Ab* en MON810 y su progenie, se analizó por Southern blot el ADN de dos conjuntos de plantas MON810, que representaban tres generaciones (Fig.1).

Se utilizaron muestras de hoja de dos conjuntos de plantas MON810 para evaluar la estabilidad del ADN insertado por medio del análisis de Southern blot (Southern, 1975). El maíz MON810 plantado en los ensayos a campo de 1994, lote de semillas MON81000 (calle 3), representa la generación F1 de cruzamiento con B73. El maíz MON810 plantado en los ensayos a campo de 1995, lote de semillas MON81010 (calle 4), era un híbrido obtenido por cruzamientos adicionales (F4). La línea control no transgénica, MON 820 (lote de semillas MON 82010) fue corrida junto con los plásmidos de transformación (calle 1, como marcador de peso molecular y control de hibridación) y solo (calle 2) como control. Las muestras de ADN de maíz fueron digeridas con las enzimas de restricción *NcoI/EcoRI* e hibridadas con una sonda correspondiente a una porción del gen *cry1Ab*.

El ADN de MON 820 más los plásmidos (calle 1) muestra el fragmento *cry1Ab* de 3,46 kb tal como se encuentra presente en el plásmido de transformación. El ADN de control solo (calle 2) muestra dos bandas tenues de fondo debidas a hibridación inespecífica (indicadas con asteriscos). Ambas muestras de ADN MON810 (calles 3 y 4), representantes de distintas líneas de cruzamientos, contienen el mismo fragmento *NcoI/EcoRI cry1Ab* de 3,1 kb. (Kania *et al.*, 1995).

Conclusión

Este análisis por Southern blot demuestra que la integración de *cry1Ab* fue estable a través de tres generaciones de cruzamientos de MON810.

Referencias

1. Kania, J., Keck, P.J., Levine, E. & Sanders, P.R. (1995). Molecular analysis of insect-protected corn line MON 810. Report Number MSL-14382, an unpublished technical report by Monsanto Company.
2. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

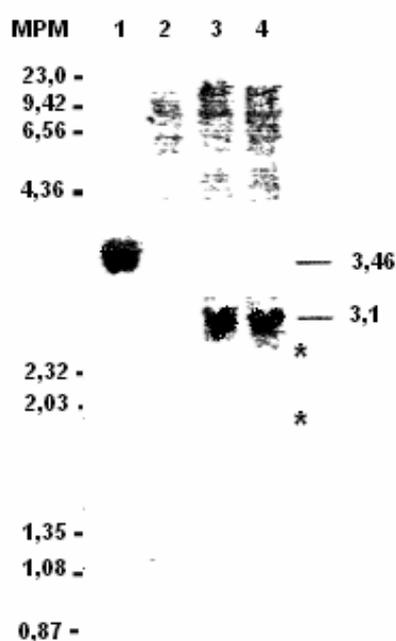


Fig. 1. Análisis por Southern blot de MON810. Las calles 1-4 contienen las siguientes muestras de ADN digeridas con *NcoI/EcoRI* e hibridadas con el gen *Cry1Ab*: ADN de MON82010 con ~15 pg de PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calle 1); ADN de MON82010 (calle 2); ADN de MON81000 (calle 3); ADN de MON 81010 (calle 4).



Capítulo 8 – Material expresado / efecto

La identificación del riesgo requiere el conocimiento de los genes introducidos, de las características, concentración y localización de los productos expresados, y las consecuencias de dicha expresión.

En los casos en que el resultado de la modificación es la expresión de una nueva proteína, o polipéptido, este material debe ser caracterizado en cuanto a: identidad, funcionalidad, y, cuando corresponda, similitud con productos de fuentes tradicionales.

La concentración de la nueva proteína expresada en los tejidos de la planta transgénica puede ser muy baja, muchas veces menos del 0,1% del peso seco. Ciertos estudios, tales como la evaluación de toxicidad aguda, que requieren relativamente grandes cantidades de material, suelen no ser factibles al utilizar la proteína purificada a partir de los tejidos de la planta. En reemplazo, dichos estudios utilizan normalmente la proteína purificada a partir de sistemas de producción bacterianos. En esos casos, es necesario demostrar la equivalencia funcional (es decir, propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas equivalentes) de las proteínas purificadas de las dos fuentes. Cuando se demuestra la equivalencia en base a estudios de reactividad serológica cruzada, es importante usar antisueros (policlonales o monoclonales) cuya especificidad haya sido bien caracterizada.

La posibilidad de modificaciones postraduccionales (por ej., glicosilación) en sistemas eucariontes también debe ser considerada, ya que puede afectar el potencial alergénico.

En los casos en los cuales la modificación resulte en la expresión de un transcrito de ARN no traducible nuevo, se deberá establecer la sensibilidad y especificidad de la acción deseada. Ejemplos de ello incluyen la producción de ARNm antisentido u otras especies de ARN que resultan en la producción reducida de una proteína endógena (por ej., plantas transgénicas que contienen secuencias antisentido insertadas). Al evaluar la seguridad de la planta modificada se deberán investigar alteraciones en la regulación o la expresión de genes endógenos no blanco.

CASO DE ESTUDIO MON810

Ensayos a campo

En 1994 y 1995 se realizaron ensayos a campo de MON810 en localidades de las principales regiones maiceras de EE.UU. Italia y Francia. La identidad y los niveles de expresión de la proteína Cry1Ab en las muestras de tejidos vegetales colectados en estos sitios fue determinada por la técnica de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) (Ledesma *et al.*, 1995).

Ensayos a campo en Estados Unidos: En 1994, los ensayos a campo se realizaron en seis localidades distribuidas a lo largo de la principal región maicera, representando una variedad de condiciones ambientales (Sanders *et al.*, 1995). De cada sitio se colectaron muestras de MON810 y de la línea control, MON818. Los niveles de las proteínas Cry1Ab, CP4 EPSPS y GOX fueron evaluados en los tejidos de maíz por ensayos de ELISA validados y específicos para cada proteína (Tabla 1; Ledesma *et al.*, 1995; Davies & Sanders, 1995; Elswick, 1995). Las plantas enteras se colectaron dos semanas luego de la polinización. Las hojas jóvenes se recolectaron tres veces, con intervalos de dos semanas para estimar los niveles de expresión durante la campaña de cultivo (expresión foliar a lo largo de la campaña). Debido a que el gen *nptII* se encuentra bajo el control de un promotor específico bacteriano y que la falta de su expresión se había demostrado previamente para MON801 en 1993 (Davies, 1995), no se realizaron estudios más detallados para la proteína NPTII en 1994.

Tabla 1. Resumen de los niveles de proteínas específicas en tejidos de MON810 cosechados en los ensayos de campo de Estados Unidos en 1994^{1,2}

Proteína	Hoja a lo largo de la campaña						
	Hoja	Grano	Planta ^{3,4}	Polen ³	1 ^o	2 ^o	3 ^o
Cry1Ab	9,35	0,31	4,15	0,09	9,78	8,43	4,91
CP4EPSPS	ND ⁵	ND	ND	NA ⁶			
GOX	ND	ND	ND	NA			
NPTII	NA	NA	NA	NA			

1. Las medias se calcularon del análisis de seis muestras vegetales, una de cada uno de los seis ensayos, a menos que se indique lo contrario
2. Todos los valores se expresan como µg de proteína/g de peso fresco
3. Las medias se calcularon del análisis de muestras vegetales de un sitio
4. Las medias se calcularon del análisis de dos muestras réplica de un sitio.
5. No detectado
6. No analizado

Los niveles de expresión de la proteína Cry1Ab en la línea MON810 de maíz fueron bajos en relación a la proteína total en hoja, grano y planta entera, pero resultó suficiente para otorgar control contra el barrenador europeo del maíz durante toda la campaña. Los mayores niveles de proteína se encontraron en hoja con 9,35 µg de Cry1Ab por gramo de peso fresco (pf), en comparación con 0,31 µg proteína/g pf en grano y 4,15 µg de la proteína/g pf en la planta completa (los rangos fueron: Cry1Ab 7,93-10,34 µg/g pf en hoja joven, 3,65-4,65 µg/g pf en planta entera y 0,19-0,39 µg/g pf en grano cosechado). Estos valores equivalen a 0,020, 0,0004 y 0,026% de la proteína por peso seco en hoja, grano y planta entera, respectivamente. La expresión de la proteína Cry1Ab en el polen estuvo apenas por encima del límite de detección (0,08 µg de la proteína/g pf). La expresión de la proteína Cry1Ab en la hoja se mantuvo alta durante los estadios de desarrollo vegetativo de la planta de maíz, tal como se detectó en los análisis de las muestras de hojas a lo largo de la campaña.

Las proteínas CP4 EPSPS y GOX no se detectaron en hoja, grano o planta entera de maíz cuando se evaluó por la técnica de ELISA. El análisis molecular de la línea MON810 de maíz también había confirmado la ausencia de los genes *cp4 epsps* y *gox* y de secuencias de *gox* y de *nptII*. Debido a que el gen *nptII* se encuentra bajo el control de un promotor específico bacteriano, el análisis de la proteína NPTII no se llevó a cabo.

Ensayos a campo en Europa: En 1995 se realizaron cinco ensayos a campo en las principales regiones maiceras de Francia e Italia. Las localidades comprendieron un rango de condiciones ambientales y de desafío por infestación con insectos plaga importantes agrónomicamente. Se colectaron muestras de plantas de MON810 y de la línea control, MON820. Se colectaron muestras de hojas jóvenes en todas las localidades; las muestras de forraje y grano se colectaron de todos los sitios excepto de Mogliano Veneto TV, que fue prematuramente destruido. En el diseño de ensayo de 1995, se colectó forraje más que plantas enteras, ya que el forraje se utiliza como alimento para animales. El forraje fue cosechado en estadio de grano pastoso. Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, CP4 EPSPS y GOX se evaluaron en las plantas de maíz usando ELISAs validados específicos para cada proteína, y se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los niveles de proteínas específicas en tejidos de MON810 cosechados en ensayos europeos en 1995¹.

		Proteína ($\mu\text{g/g}$ peso fresco)		
		Cry1Ab	CP4 EPSPS ²	GOX ²
Hoja	media ³	8,60	ND ⁴	ND
	rango ⁵	7,59-9,39	NA ⁶	NA
Forraje ⁷	media	6,08	ND	ND
	rango	4,21-9,23	NA	NA
Grano ⁸	media	0,53	ND	ND
	rango	0,42-0,69	NA	NA

1. Todos los valores se expresan como μg de proteína/g de peso fresco
2. El análisis molecular demostró que los genes CP4epsps y gox no están presentes en MON810
3. Las medias se calcularon del análisis de una muestra combinada (pool) de 5 sitios
4. No detectado
5. El rango indica los valores máximos y mínimos del análisis de las muestras de 5 sitios.
6. No aplicable. Como la proteína no se detecta, no hay rango.
7. La media y el rango se calcularon del análisis de dos plantas combinadas (pool) de 4 sitios

Los niveles de la proteína Cry1Ab oscilaron entre 7,59 – 9,39 $\mu\text{g/g}$ pf en hoja joven, 4,21-9,23 $\mu\text{g/g}$ en forraje y 0,42-0,69 $\mu\text{g/g}$ en grano cosechado. Las proteínas CP4 EPSPS y GOX no se detectaron en los tejidos de las plantas MON810. Los niveles de la proteína Cry1Ab en estos tejidos son similares a los obtenidos en las plantas crecidas en los ensayos a campo en EE.UU. y Europa durante dos generaciones sucesivas. Los ensayos a campo se realizaron tanto en Italia como en Francia, para producir muestras de hojas, forraje y grano para los análisis de expresión de los híbridos de maíz protegidos contra insectos. Los cinco híbridos de maíz fueron desarrollados cruzando el evento MON810 con líneas endocriadas comerciales. Se usaron versiones no modificadas de los mismos híbridos como controles. Las muestras de hoja se colectaron solo de Italia, mientras que las muestras de forraje y grano se colectaron de ambos sitios. Los niveles de proteína Cry1Ab en las muestras de maíz se evaluaron usando ELISA validado (Tabla 3). Los ELISAs para las proteínas CP4 EPSPS y GOX no se realizaron ya que los genes correspondientes no están presentes en la línea MON810 (la ausencia de estas proteínas fue confirmada en los ensayos a campo previos (Tablas 1 y 2)). Los ensayos a campo fueron autorizados con los permisos N° B/IT/95-23 y 95.03.06 de Italia y Francia, respectivamente. El nivel de la proteína Cry1Ab en la progenie de MON810 osciló entre 8,20-10,51 $\mu\text{g/g}$ pf en hoja joven, 4,00-5,11 $\mu\text{g/g}$ en forraje y 0,35-0,60 $\mu\text{g/g}$ en grano cosechado. Los niveles de la proteína Cry1Ab son similares a los de las plantas derivadas de MON810 por retrocruzas con B73/Mo17 (Tablas 1 y 2) e híbridos comerciales (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los niveles de la proteína Cry1Ab en tejidos de la progenie de MON810 crecida en los ensayos europeos de 1995¹

		Proteína Cry1Ab ($\mu\text{g/g}$ peso fresco)
Hoja	media ²	9,26
	rango ³	8,20-10,51
Forraje ⁴	media	4,52
	rango	4,00-5,11
Grano ⁵	media	0,46
	rango	0,35-0,60

1. Cinco híbridos plantados en dos sitios. Todos los valores se expresan como μg de proteína/g de peso fresco.
2. Las medias se calcularon del análisis de alícuotas de muestras combinadas de un sitio en Italia.
3. El rango indica los valores máximos y mínimos del análisis de las muestras de un sitio en Italia.
4. La media y el rango se calcularon del análisis de una o dos plantas colectadas en ambos sitios.
5. La media y el rango se calcularon del análisis de muestras combinadas de granos colectadas en ambos sitios.

Conclusión

El nivel de la proteína Cry1Ab en las plantas MON810 es similar cuando las plantas se cultivan en distintas condiciones geográficas, y cuando el gen está presente en diferentes fondos genéticos. El nivel de expresión se mantiene constantemente alto como para otorgar control contra los insectos blanco plaga a lo largo de la campaña.

Análisis por Western blot

Metodología para la evaluación de la proteína Cry1Ab

Las muestras para la evaluación de la proteína Cry1Ab se prepararon a partir de tejido foliar (1,0g) moliéndolo en nitrógeno líquido y posteriormente homogeneizándolo en 5 ml de bicarbonato de sodio 0,1 M pH 10,01 con 2-mercaptoetanol 10mM, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 1 mM benzamidina-HCl, 0,5 mM PMSF, 1µg/ml pepstatina A, 40 µg/ml bestatina, 1mM CWS y 10% (v/v) glicerol. Luego de una centrifugación (20.000 g x 15 min) para remover los desechos celulares, una alícuota de 2,5 ml de la solución del sobrenadante fue desalada por cromatografía de exclusión en gel de Sephadex PD-10 (Farmacia). El volumen de exclusión fue concentrado 4-5 veces usando un microconcentrador Centricon 30 (Amicon) y un volumen de 100 µl de la solución concentrada fue combinado 1:1 con una mezcla para muestra en SDS-PAGE, desnaturizado por calor (5 min a 100°C), y sometido a electroforesis utilizando el método de Laemmli (1970).

La tripsinización de las alícuotas de 200 µl de cada extracto (ver más arriba) fue iniciada con la adición de 7 µl de una solución de tripsina pancreática bovina (5 mg/ml en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM CaCl₂) tratada con TPCK (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona). Las muestras se incubaron durante ~18 horas y luego se inactivó la reacción con 1,25 µl de PMSF 200 mM. Alícuotas (50 µl) de cada extracto fueron combinadas 1:1 con una mezcla para muestra en SDS-PAGE, desnaturizadas por calor (5 min a 100°C), y sometidas a electroforesis utilizando el método de Laemmli (1970).

Las muestras para el análisis de las proteínas GOX y CP4 EPSPS fueron preparadas por homogenización de tejido foliar joven en una solución tamponada [100 mM Tris, 100 mM borato de sodio, 5 mM MgCl₂ pH 7.8, 0.5% (v/v) Tween-20, y 0.2% (w/v) L-ácido ascórbico], seguida por centrifugación (como se indicó más arriba) para remover los desechos celulares. Alícuotas (50 µl) del sobrenadante fueron sometidas a SDS-PAGE como se describe más arriba.

Las proteínas separadas fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF (polivinilideno difluoruro) (Immobilon, Millipore Corp.) y los sitios de unión de proteínas no específicos fueron posteriormente bloqueados por incubación con una solución TBST (0.1 M Tris base, 10 mM borato de sodio, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) adicionada con 5% (v/v) de leche en polvo descremada (1 hora, temperatura ambiente). La membrana con las proteínas transferidas fue incubada secuencialmente con antisuero de conejo contra la proteína Cry1Ab expresada en *E. coli* (1:1000) y con anticuerpos de burro conjugados a fosfatasa alcalina contra IgG de conejo (1:1000; Jackson Immunoresearch). El anticuerpo unido fue visualizado usando el sistema de sustrato colorimétrico NBT/BCIP (Promega).

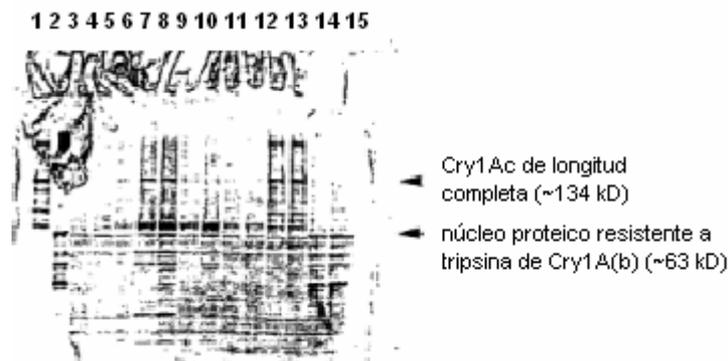


Fig. 1. Análisis de Western blot de la proteína Cry1Ab en extractos de tejidos de maíz. Proteína completa Cry1Ac producida en *E. coli*, ~20 ng (calle 1); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng (calle 2); extracto proteico de hoja de MON 818, ~28 µg (calle 3); extracto proteico de hoja de MON 819, ~24 µg (calle 4); extracto proteico de hoja de MON 801, ~39 µg (calle 5); extracto proteico de hoja de MON 802, ~25 µg (calle 6); extracto proteico de hoja de MON 805, ~32 µg (calle 7); extracto proteico de hoja de MON 809, ~26 µg (calle 8); extracto proteico de hoja de MON 810, ~26 µg (calle 9); extracto proteico de hoja de MON 813, ~27 µg (calle 10); extracto proteico de hoja de MON 814, ~20 µg (calle 11); proteína completa Cry1Ac producida en *E. coli*, ~20 ng agregados a ~19 µg de extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 12); proteína completa Cry1Ac producida en *E. coli*, ~20 ng agregados a ~16 µg de extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 13); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregados a ~19 µg de extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 14); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregado a 16 µg de extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 15).

Resultados

Proteína Cry1Ab: El perfil para la proteína Cry1Ab proveniente de extractos foliares no tripsinizados de siete líneas de maíz protegido contra insectos fue comparado con un estándar Cry1Ac de longitud completa (~134 kD) y con un estándar correspondiente al núcleo proteico resistente a tripsina de Cry1A(b) (~63 kD) (Fig. 1). Se utilizó el estándar Cry1Ac de longitud completa porque es aproximadamente del mismo tamaño que la proteína Cry1Ab de tamaño completo (131 kD) y produce reacción cruzada con el mismo anticuerpo (Lee *et al.*, 1995b). Dos líneas control, MON818 y MON 819, fueron incluidas para representar el fondo genético de las siete líneas del ensayo. Se observaron bandas inespecíficas menores en los extractos correspondientes a las dos líneas control, MON818 y MON 819 (calles 3 y 4). Sin embargo, estas bandas inespecíficas se observaron en los extractos foliares de todas las líneas de maíz (protegidas contra insectos y controles).

Para las líneas MON801, MON802, MON805, y MON809 se observó una banda concordante con la forma de longitud completa en el sitio de peso molecular esperado (~131 kD) (calles 5-8). La línea MON810 contiene un gen *cry1Ab* menor al de longitud completa y por lo tanto no muestra un producto proteico de 131 kD (calle 9, Kania *et al.*, 1995). Del mismo modo que comúnmente se observa en los análisis por Western blot de proteínas provenientes de B.t.k. (Lee *et al.*, 1995b), se observaron múltiples productos proteicos inmunoreactivos para las líneas de maíz protegido contra insectos (calles 5-11). No hubo diferencias aparentes en el rango de tamaños de los productos proteicos menores al de longitud completa observados en las siete líneas de maíz protegido contra insectos producidas con el mismo gen *cry1Ab* de longitud completa (calles 5-11).

Para los extractos tripsinizados, se observaron bandas inmunoreactivas menores en los extractos de ambas líneas control, MON818 y MON 819 (Fig. 2, calles 3 y 4). Sin embargo, estas bandas inespecíficas se observaron para los extractos foliares de la mayoría de las líneas de maíz (protegidas contra insectos y controles). Las siete líneas transgénicas mostraron el núcleo proteico resistente a tripsina a la altura de ~63 kD (Fig. 2, calles 6-12), luego del tratamiento con tripsina, como se informó anteriormente (Lee & Bailey, 1995). En la totalidad de las siete líneas transgénicas evaluadas no se observaron diferencias cualitativas detectables en los extractos tratados con tripsina.

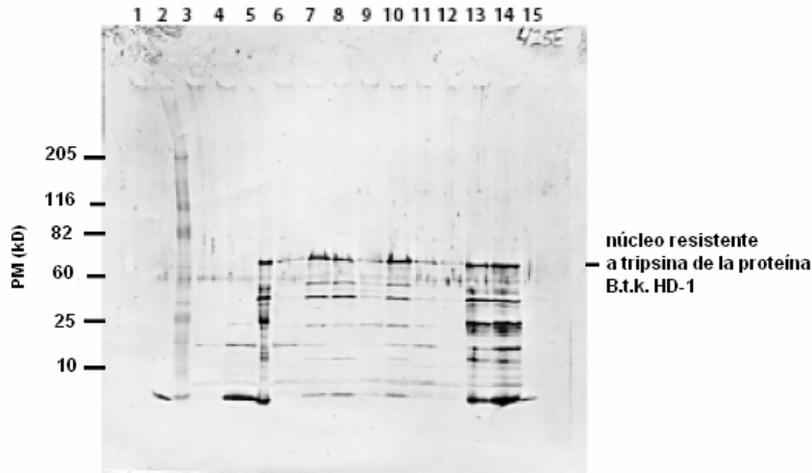


Fig. 2. Análisis por Western blot de las proteínas Cry1Ab tripsinizadas de extractos de tejidos de maíz. Calle en blanco, 1X SeptraSol (calle 1); marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 2); extracto proteico de hoja de MON 818, tripsinizado (calle 3); extracto proteico de hoja de MON 819, tripsinizado (calle 4); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab *producida en E. coli*, ~20 ng (calle 5); extractos tripsinizados de las líneas MON 801, 802, 805, 809, 810, 813, y 814 (calles 6-12, respectivamente); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab *producida en E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto MON 818 (calle 13); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab *producida en E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto de MON 819 (calle 14); calle en blanco, 1X SeptraSol (calle 15). No se determinó la carga/calle de proteínas para los extractos. Se cargaron ~7.5 µl de cada extracto de maíz en un volumen total de ~15 µl (calles 3-4, 6-12). Cuando se agregaron a estándares (calles 13-14), se emplearon ~5 µl del extracto de la línea de maíz control (MON 818 y MON 819) en ~10 µl de volumen total.

Proteína CP4 EPSPS: Los extractos de tejido foliar joven de las siete líneas de maíz protegido contra insectos fueron comparados con un estándar de la proteína CP4 EPSPS producida en *E. coli* (Fig. 3). No se observaron bandas para los extractos provenientes de cualquiera de las líneas control, MON818 y MON 819 (calles 5 y 6). No se detectó la proteína CP4 EPSPS para la línea de maíz MON 814 (calle 7). Los extractos proteicos de tejido foliar joven de las líneas MON813, MON809, MON805, MON802 y MON801 mostraron el producto proteico de CP4 EPSPS esperado de 47,6 kD en comparación con el estándar de proteína CP4 EPSPS purificada (calles 8, 10-14). La línea de maíz MON810 no contiene el gen *cp4 epsps* y por lo tanto no expresa la proteína CP4 EPSPS (calle 9) (Kania *et al.*, 1995).

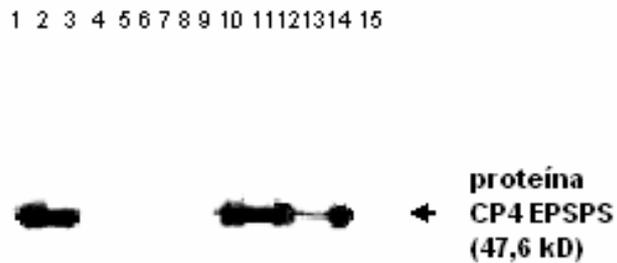


Fig. 3. Análisis por Western blot de la proteína CP4 EPSPS en extractos de tejidos de maíz. Marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 1); ~20 ng de la proteína CP4 EPSPS producida en *E. coli* agregada al extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 2); ~20 ng de la proteína CP4 EPSPS producida en *E. coli* agregada al extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 3); en blanco (calle 4); extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 5); extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 6); extracto proteico de hoja de MON 814 (calle 7); extracto proteico de hoja de MON 813 (calle 8); extracto proteico de hoja de MON 810 (calle 9); extracto proteico de hoja de MON 809 (calle 10); extracto proteico de hoja de MON 805 (calle 11); extracto proteico de hoja de MON 802 (calle 12); extracto proteico de hoja de MON 801 (calle 13); ~20 ng de la proteína CP4 EPSPS producida en *E. coli* (calle 14); Marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 15).

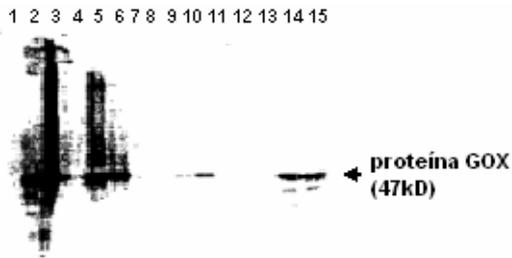


Fig. 4. Análisis por Western blot de la proteína GOX en extractos de tejidos de maíz. Marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 1); ~20 ng de la proteína GOX producida en *E. coli* (calle 2); proteína GOX aislada de la línea de maíz 423-06-01 (calle 3); extracto proteico de hoja de MON 801 (calle 4); extracto proteico de hoja de MON 802 (calle 5); extracto proteico de hoja de MON 805 (calle 6); extracto proteico de hoja de MON 809 (calle 7); extracto proteico de hoja de MON 810 (calle 8); extracto proteico de hoja de MON 813 (calle 9); extracto proteico de hoja de MON 814 (calle 10); extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 11); extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 12); en blanco (calle 13); proteína GOX producida en *E. coli*, ~20 ng, agregada a un extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 14); proteína GOX producida en *E. coli*, ~20 ng, agregada a un extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 15).

Proteína GOX: Los extractos de tejido foliar joven de las siete líneas de maíz protegido contra insectos fueron comparados con un estándar de la proteína GOX producida en *E. coli* (Fig. 4). Los extractos proteicos de las líneas de maíz MON802, MON805, MON813 y MON814 (calles 5, 6, 9 y 10) mostraron el producto proteico esperado de 47 kD en comparación con el estándar proteico GOX purificado (calles 2, 14 y 15). La proteína GOX no se detectó en las líneas de maíz MON801, MON809 y MON810 (calles 4, 7 y 8). El nivel de proteína GOX en las hojas de la línea de maíz MON801 está por debajo del límite de detección para los análisis de Western blot y ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA) (Sanders *et al.*, 1995). La línea de maíz MON810 no contiene el gen *gox* y por lo tanto no expresa la proteína GOX (Kania *et al.*, 1995). Como era de esperar, no se observaron bandas en los extractos provenientes de las dos líneas control, MON88 y MON819 (Fig. 4, calles 11 y 12).

Conclusión

En resumen, la proteína Cry1Ab en la línea MON810 muestra un producto inmunoreactivo del tamaño esperado cuando se lo compara con un estándar proteico purificado. Las proteínas CP4 EPSPS y GOX no están presentes en MON810.

Equivalencia de la proteína Cry1Ab expresada en plantas y en bacterias

El bajo nivel de expresión de Cry1Ab en las plantas de maíz protegido contra insectos impide la purificación de proteína en cantidades suficientes como para su caracterización. Como alternativa, se caracterizó la proteína Cry1Ab funcionalmente activa producida en células microbianas para verificar su equivalencia estructural y funcional con la proteína expresada en planta de modo de poder utilizar la proteína expresada en bacterias en la evaluación de seguridad. Como se espera que la proteína Cry1Ab de longitud completa (~131 kD) producida por las plantas de maíz protegidas contra insectos sea rápidamente convertida a la forma de núcleo proteico resistente a tripsina (~63 kD) al ser ingerida, Monsanto propuso y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos aceptó, que el núcleo resistente a tripsina (NRT) de Cry1Ab era un material apropiado para evaluar la seguridad de la proteína de longitud completa.

El NRT de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* fue purificado (Heeren *et al.*, 1992), caracterizado (Berberich & Lee, 1994), y evaluado para determinar su seguridad en estudios de toxicidad aguda (Taylor, 1992). También se estudió el destino digestivo del NRT de Cry1Ab (Ream, 1994). El NRT de Cry1Ab fue purificado de la línea 754-10-I de maíz protegido contra insectos (Lee *et al.*, 1995c) y mostró ser equivalente al NRT de Cry1Ab producido en *E. coli* cuando se lo estudió utilizando un conjunto exhaustivo de pruebas físicas y funcionales (Lee *et al.*, 1995a). Se realizó una prueba adicional (análisis por Western blot) que mostró que el NRT de Cry1Ab producido en hojas y semillas de la línea de maíz MON801 protegido contra insectos (MON80100) era equivalente al producido tanto en *E. coli* como también en la línea 754-10-I de maíz protegido contra insectos, basándose en los pesos moleculares aparentes y la inmunorreactividad específica (Lee *et al.*, 1995a).

Este estudio evaluó la equivalencia del NRT de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* y varias otras líneas de maíz protegido contra insectos, incluyendo MON810. Esta evaluación de equivalencia sirve como justificación para el uso de la información de seguridad generada con el NRT de Cry1Ab producida en *E. coli* para avalar la seguridad de la proteína Cry1Ab expresada en estas líneas de maíz.

Materiales y Métodos

La proteína Cry1Ab fue extraída de tejido foliar de MON802, MON805, MON809, MON810, MON813, y MON814, crecidos en condiciones de invernadero. También se prepararon extractos proteicos de hojas de plantas crecidas en invernadero de las líneas MON818 y MON819. Las muestras de referencia fueron el núcleo resistente a tripsina de Cry1Ab de ~63 kD, preparado por tripsinización de la proteína de longitud completa producida en *E. coli* (Berberich & Lee, 1994), y el NRT de la proteína Cry1Ab extraída de la línea de maíz protegido contra insectos MON 801 (Lee et al., 1995a).

Los extractos proteicos de tejido foliar de las líneas de prueba, de referencia, y controles fueron preparados como se indica a continuación para el subsiguiente análisis, usando el procedimiento analítico de Western blot. Las muestras de tejido foliar fueron pulverizadas en nitrógeno líquido, homogeneizadas en solución tamponada TBA (100 mM Tris-HCl, 100 mM borato de sodio, pH 7,8, 5 mM MgCl₂, 0,05% (v/v) Tween-20, y 0.2% (p/v) ácido ascórbico) usando una proporción de 0,1 g de tejido en 1 ml de *buffer*, y luego se centrifugaron. Se inició la tripsinización de alícuotas de 200 µl de cada sobrenadante con la adición de 7 µl de una solución de 5 mg/ml de tripsina pancreática bovina (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM CaCl₂) tratada con TPCK. Las muestras se incubaron durante ~18 horas y luego se inactivó la reacción con 1,25 µl de PMSF 200 mM. Una alícuota (50 µl) de cada extracto fue combinada 1:1 con una mezcla para muestra en SDS-PAGE, desnaturalizadas por calor (5 min; 100°C), y sometidas a electroforesis utilizando el método de Laemmli (1970).

Las proteínas separadas fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF (polivinilideno difluoruro) (Immobilon, Millipore Corp.) y los sitios de unión a proteínas no específicos fueron posteriormente bloqueados por incubación con una solución TBST (0.1 M Tris base, 10 mM borato de sodio, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) adicionada con 5% (v/v) de leche en polvo descremada (1 hora, temperatura ambiente). La membrana con las proteínas transferidas fue incubada secuencialmente con antisuero de conejo contra el NRT de la proteína Cry1Ab expresada en *E. coli* (1:1000) y con anticuerpos de burro conjugados con fosfatasa alcalina contra IgG de conejo (1:1000; Jackson Immunoresearch). El anticuerpo unido fue visualizado usando el sistema de sustrato colorimétrico NBT/BCIP (Promega). El procedimiento analítico de Western blot, tal como se lo utilizó en este estudio, provee una comparación cualitativa, no cuantitativa entre las muestras; por lo tanto, no se emplearon métodos estadísticos para los análisis de Western blot.

Resultados

Los resultados se muestran en la Fig. 5. En los extractos preparados a partir de cada una de las líneas de maíz de prueba (MON802, MON805, MON809, MON810, MON813, y MON814) se observó una banda inmunorreactiva con el mismo peso molecular aparente de ~63 kD que el núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* utilizado como estándar de referencia y que la línea de maíz de referencia MON801. La banda observada a la altura del peso molecular esperado (~63 kD) en las líneas de maíz de prueba y de referencia resultó ser la banda predominante en todos los casos. Se observaron claramente dos bandas inmunorreactivas de menor tamaño en las líneas de prueba MON802, MON805 y MON810 (calles 7, 8 y 10). Estas bandas indudablemente representan otros fragmentos proteolíticos de Cry1Ab (calles 7, 8 y 10). Estas bandas también se encuentran presentes en otras líneas, pero en menor intensidad. Se observó una banda de aproximadamente 20 kD en los extractos de todas las líneas de maíz, incluyendo las líneas control MON818 (calle 3) y MON 819 (calle 4). Esta banda representa una reactividad cruzada no específica de fondo que no está relacionada

con el NRT de Cry1Ab. Los resultados obtenidos en este estudio claramente demuestran que el NRT de Cry1Ab producido en *E. coli* y en MON810 son equivalentes.

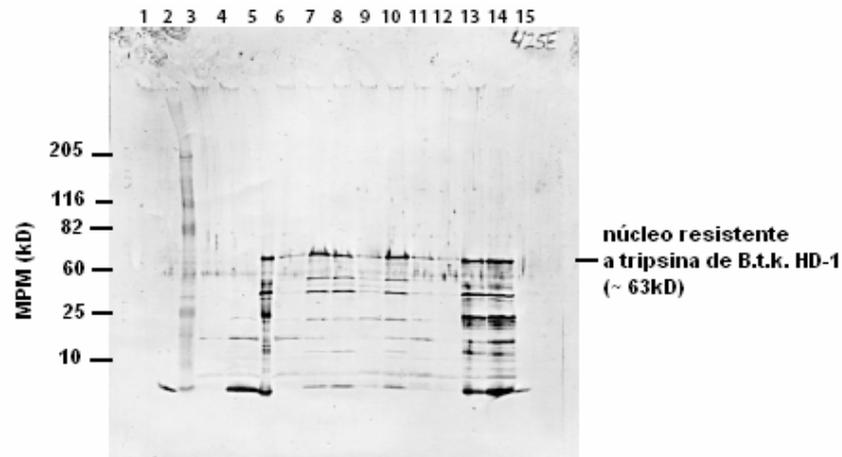


Fig. 5. Análisis por Western blot de las proteínas Cry1Ab tripsinizadas de extractos de tejidos de maíz. Calle en blanco, 1X SepraSol (calle 1); marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 2); extracto proteico de hoja tripsinizado de MON818 (calle 3); extracto proteico de hoja tripsinizado de MON819 (calle 4); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng (calle 5); extractos tripsinizados de las líneas MON801, 802, 805, 809, 810, 813, y 814 (calles 6-12, respectivamente); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto de MON818 (calle 13); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto de MON819 (calle 14); en blanco, 1X SepraSol (calle 15). No se determinó la carga proteica para los extractos de maíz. Se agregaron ~7.5 µl de cada extracto de maíz a ~15 µl de volumen total (calles 3-4, 6-12). Cuando se usaron estándares (calles 13-14), se agregaron ~5 µl del extracto de la línea maíz control (MON818 y MON819) a un volumen total de ~10 µl.

Conclusión

Se demostró por análisis de Western blot que la línea de maíz MON810 contiene un núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina que es equivalente al núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina producido en *E. coli* utilizado para los estudios de seguridad. La equivalencia establecida por estos ensayos sirvió como justificación para el uso de la información de seguridad generada con el núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina para avalar la seguridad del núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina expresado en esta línea de maíz protegido contra insectos.

Referencias

- Berberich, S. A. & Lee, T. C. (1994). Characterization of purified *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 trypsin-resistant core protein produced in *Escherichia coli*, Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13479.
- Davies, S.R. (1995). Development and validation of an enhanced chemiluminescence western blot for the detection and quantitation of neomycin phosphotransferase (NPT II) in maize tissues. Report Number MSL-13790, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
- Davies, S. R. & Sanders, P.R. (1995). Validation of a direct ELISA to detect and quantitate glyphosate oxidoreductase, GOX, protein in maize plant tissues. Report number MSL -13527, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
- Elswick, E. (1995). Validation of a direct ELISA to detect and quantitate CP4 5-Enol-Pyruvyl shikimate3-phosphate protein in maize plant tissues. Report Number MSL-13576, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
- Heeren, R. A., Johnson, G. V., Berberich, S. A., Fuchs, R. L., Grabner, R. W. & Gustafson, M. E. (1992). Purification of recombinant *Bacillus thuringiensis* HD-1 tryptic core. Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-11904.
- Kania, J., Keck, P., Levine, E. & Sanders, P. (1995). Molecular analysis of insect protected maize line MON 810. Monsanto Technical Report MSL-14382, St. Louis.
- Laemmli, U. K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

8. Ledesma, B. E., Berberich, S.A. & Sanders, P.R. (1995). Validation of a direct ELISA to detect and quantitate Btk HD-1 protein in European maize borer resistant maize plants. MSL-13664, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
9. Lee, T. C., Bailey, M., Sims, S., Zeng, J., Smith, C. E., Shariff, A., Holden., L. R. & Sanders, P. R. (1995a). Assessment of the equivalence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein produced in *Escherichia coli* and European maize borer resistant maize. Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13864. EPA MRID # 43533204
10. Lee, T. C., Bailey, M. & Sanders, P. R. (1995b). Compositional comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein produced in ECB resistant maize and the commercial microbial product, DIPEL. Monsanto Technical Report MSL-13876, St. Louis. Study Number 94-01-39-12.
11. Lee, T. C., Zeng, J. & Ledesma, B. E. (1995c). Purification of B.t.k. HD-1 Protein from European Maize Borer Resistant Maize. Monsanto Technical Report, St Louis, MSL-13879.
12. Naylor, M. (1992). Acute oral toxicity study of B.T.K. HD-1 tryptic core protein in albino mice. Study number 92069, an unpublished study conducted by Monsanto Compnay. EPA MRID no. 43468001.
13. Ream, J. E. (1994). Assessment of the in vitro digestive fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein. Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13425. EPA MRID # 43439201
14. Sanders, P.R., Elswick, E.N., Groth, M.E. & Ledesma, B.E. (1995). Evaluation of insect protected maize lines in 1994 U.S. field test locations. Study Number 94-01-39-01, MSL-14179, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43665502.



Capítulo 9 – Transferencia génica a plantas emparentadas

La introgresión de información genética desde una planta hacia otra es significativa sólo si las dos plantas son sexualmente compatibles y si su descendencia híbrida es viable. Para evaluar el potencial riesgo ambiental asociado con el cruzamiento de las plantas transgénicas, se debe conocer la biología reproductiva de la planta y la distribución de las especies emparentadas sexualmente compatibles, y se debe comprender el impacto de la característica introducida, en caso de que sea introgresada en otras especies vegetales. La información relacionada con los primeros requisitos se puede obtener de revisiones bibliográficas sobre la biología de las especies vegetales, literatura científica que incluya relevamientos de especies vegetales regionales, agrobiólogos extensionistas, y especialistas en malezas.

Una evaluación de riesgo debería siempre presuponer que la planta transgénica en revisión es capaz de realizar fecundación cruzada con las especies sexualmente compatibles a menos que exista fundada evidencia experimental que indique lo contrario (por ej.: si se ha generado una planta transgénica estéril). La importancia ambiental de la introgresión de la característica variará con cada combinación característica/planta. Por ejemplo, el flujo de la característica de tolerancia a un herbicida (TH) desde *Brassica napus* (canola) hacia una maleza emparentada es considerado un bajo riesgo ambiental ya que la tolerancia a un herbicida no aumenta la capacidad adaptativa de un híbrido TH/no-TH, o su progenie, en ausencia de la presión de selección ejercida por el herbicida. Además, un híbrido tolerante a un herbicida que llegara a surgir puede ser efectivamente controlado usando estrategias de control alternativas que son parte del sistema de cultivo tradicional de canola. Contrariamente, la introgresión de un gen de resistencia a insectos desde el algodón transgénico hacia poblaciones de *Gossypium* silvestres podría teóricamente incrementar la capacidad adaptativa de estos últimos si el insecto blanco fuera responsable de limitar el tamaño o la distribución poblacional de la especie silvestre emparentada.

CASO DE ESTUDIO MON810

La información del caso de estudio presentado a continuación fue desarrollada para abordar el cultivo del maíz MON810 resistente a insectos en el territorio continental de EE. UU. y no puede ser aplicado en ningún otro lado. El maíz tiene flores unisexuadas: las flores masculinas se localizan en el extremo apical del tallo en la panoja, una inflorescencia ramificada; y las flores femeninas se encuentran en espigas compactas localizadas en los extremos de ramificaciones cortas cerca de la mitad del tallo. Esta disociación de las flores femeninas y masculinas en estructuras separadas distingue a la planta de maíz de otros cereales, y es la razón principal por la cual el maíz es un cultivo de polinización cruzada. La producción de polen es ingente en comparación con otras especies de cultivos domesticadas. El maíz tiene polinización anemófila (por el viento), y la distancia que puede recorrer el polen viable depende del patrón de vientos prevaleciente, la humedad y la temperatura. El polen de maíz permanece viable menos de 24 horas luego de su liberación (la viabilidad promedio es inferior a las 3 horas). El polen de maíz se mueve libremente dentro de un área, se deposita sobre las barbas del mismo cultivar o de cultivares distintos, germina casi inmediatamente luego de la polinización, y dentro de las 24 horas completa la fertilización.

Para que ocurra el flujo génico por la vía normal de transmisión sexual, deben existir ciertas condiciones:

- Los dos parentales deben ser sexualmente compatibles,
- El período de fecundidad de ambos debe coincidir,
- Debe existir un vector adecuado para el polen y ser capaz de transferir el polen entre los dos parentales, y
- La progenie resultante debe ser fértil y ecológicamente apta para el medioambiente en el que se sitúan.

Fecundación cruzada con especies silvestres del género *Zea*

El maíz (*Zea mays ssp. mays*) y el teosinte anual (*Zea mays ssp. mexicana*) son genéticamente compatibles, ambos tienen polinización anemófila, y en las áreas de México y Guatemala hibridan libremente cuando se encuentran próximas entre sí. El maíz se cruza fácilmente con el teosinte, pero el teosinte no se encuentra presente en Canadá o en EE.UU., excepto en plantaciones especiales. No existen informes de casos en los que el teosinte ocurra como maleza en los márgenes de plantaciones de maíz en la zona de producción de maíz de EE.UU. Las preferencias de hábitat de *Tripsacum*, un género muy emparentado a *Zea*, son similares a las del teosinte, con doce de las dieciséis especies nativas de México y Guatemala. *Tripsacum floridanum* (hierba de La Florida) es nativa del extremo sur de Florida. La fecundación cruzada con las especies del género *Tripsacum* no ocurre en estado silvestre y sólo con suma dificultad se puede cruzar al maíz con dicho género. Además, la progenie de cruzamientos de *Zea* x *Tripsacum* muestran niveles variables de esterilidad (Galinat, 1988; Mangelsdorf, 1974; Russell & Hallauer, 1980). No se conocen casos de flujo génico entre el maíz y sus especies emparentadas en Canadá o EE.UU.

Fecundación cruzada con variedades cultivadas del género *Zea*

El intercambio génico entre variedades de maíz cultivadas y genéticamente modificadas será similar al que ocurre naturalmente en la actualidad entre las variedades cultivadas de maíz. El polen transportado por el viento se moverá entre plantas dentro del mismo campo y en campos cercanos. La transferencia de la característica transgénica a otras variedades de maíz cultivado no impartirá ningún problema de seguridad adicional a los ya identificados y abordados para el maíz transgénico original.

Conclusión

En resumen, el flujo génico (fecundación cruzada) desde el maíz cultivado (tanto sea genéticamente modificado o convencional) hacia especies silvestres emparentadas no se considera un riesgo significativo en Canadá o el territorio continental de EE.UU. Aunque la potencial transferencia de las nuevas características desde el maíz modificado genéticamente hacia otras variedades de maíz cultivadas origina cuestiones relacionadas con la pureza varietal, la certificación de semillas, o la segregación de productos, no origina preocupaciones adicionales sobre la seguridad ambiental. El impacto ambiental de la característica nueva en el maíz cultivado habrá sido considerado en la evaluación de riesgo ambiental de la línea genéticamente modificada y la transferencia de la característica, intencional o no, a otras variedades no resultará en riesgos nuevos o adicionales.

Referencias

1. Galinat, W.C. (1988). The origin of corn. In *Corn and Corn Improvement* (Third Edition). eds. Sprague, G.F. and Dudley, J.W. pp. 1-31. American Society of Agronomy. Inc., Crop Science Society of America Inc. and Soil Science Society of America. Inc. Madison, Wisconsin.
2. Mangelsdorf, P.C. (1974). *Corn - Its Origin, Evolution, and Improvement*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, USA.
3. Russell, W.A. & Hallauer, A.R. (1980). Corn. pp. 299-312. In: Fehr, W.R. and Hadley, H.H., Editors. *Hybridization of Crop Plants*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Publishers, Madison, Wisconsin, USA.

Capítulo 10 - Transferencia génica a organismos no emparentados

La transferencia génica horizontal (TGH) es el intercambio no sexual de material genético entre organismos que pertenecen a la misma o distinta especie. Es un fenómeno que ocurre naturalmente, se demostró por primera vez en bacterias (Veal *et al.*, 1992; Wellington & van Elsas, 1992; Nielsen *et al.*, 1998), y su importancia en la evolución del genoma procarionte se ha inferido a partir de análisis filogenéticos (Jain *et al.*, 1999). Como lo indican algunos estudios recientes, la TGH, que ocurre naturalmente, no se encuentra limitada a bacterias. Se han identificado en muchas plantas con flor genes fúngicos transferidos a intrones de grupo I, que son elementos genéticos móviles que se autoprocenan y se encuentran principalmente en genomas de organelas y genes nucleares de ARN ribosomal (Cho *et al.*, 1998). Además existe fuerte evidencia a favor del movimiento de genes que se encuentran en elementos transponibles entre distintas especies de insectos (Robertson & Lampe, 1995), y entre bacterias e insectos (Hawtin *et al.* 1995).

La posibilidad de TGH entre plantas y bacterias en el suelo o en el intestino, particularmente ya que esto se relaciona con la posible transferencia de genes que codifican resistencia a antibióticos, ha sido vista como un riesgo asociado con las plantas modificadas por ingeniería genética (GM) (Bergmans, 1993; Rissler & Mellon, 1993). La importancia de esta preocupación como un riesgo depende de la probabilidad de que la TGH ocurra y de la magnitud del resultado adverso asociado (para una revisión bibliográfica reciente, ver Nielsen *et al.*, 1998; Droge *et al.*, 1998). Estos dos temas son explorados dentro del contexto de evaluación de seguridad de las plantas transgénicas para la salud humana y el medioambiente.

Probabilidad de transferencia génica horizontal entre plantas y bacterias

La transferencia natural de material genético desde algunas bacterias fitopatógenas hacia las plantas ya ha sido establecida. Por ejemplo, los síntomas de la enfermedad "agalla de la corona" causada por *Agrobacterium tumefaciens* se deben a la transferencia e integración estable dentro del genoma de la planta, de genes de biosíntesis de hormonas que se encuentran presentes en un plásmido bacteriano. El proceso reverso tiene que ser aún demostrado en un ambiente natural, sin embargo, numerosos estudios han intentado establecer su posibilidad.

El escenario más probable para la TGH desde plantas hacia bacterias involucra la transformación natural (Nielsen *et al.*, 1998; Bertolla & Simonet, 1999) de bacterias competentes con ADN vegetal libre liberado al suelo o al tracto digestivo de humanos o animales. En este proceso deben ocurrir un número de eventos en forma separada, cuya probabilidad de ocurrencia depende de la disponibilidad del tipo correcto de ADN, el tipo de bacteria, la capacidad de estas bacterias para tomar ADN y para ser transformadas por ese ADN, y la competitividad de las bacterias transformadas.

Disponibilidad de ADN

El conocimiento convencional de que los fragmentos de ADN de gran peso molecular son rápidamente degradados en el suelo (Greaves & Wilson, 1970; Blum *et al.*, 1997) ha sido cuestionado por estudios recientes que demuestran que el ADN puede ser estabilizado por adsorción a constituyentes del suelo, tales como la arcilla (Paget *et al.*, 1992), cuarzo, feldepasto, minerales pesados, al igual que ácidos húmicos, y puede persistir durante semanas o meses (Gebhard & Smalla, 1999; Nielsen *et al.*, 1997a; Widmer *et al.*, 1996). Se ha informado que este tipo de 'secuestro' de ADN inhibe (Tebbe & Vahjen, 1993) y también mantiene, o potencia (Pietramellara *et al.*, 1997), la capacidad transformante. Así mismo, también se mostró que el ADN puede ser preservado en tejido vegetal muerto, quizás protegido por las paredes celulares, con capacidad transformante durante al menos algunos pocos días (Nielsen *et al.*, 2000a).

Estos datos indican que, dependiendo de las variadas condiciones del suelo, tales como la composición, el pH, la humedad, y la actividad microbiana, el ADN vegetal puede estar

biológicamente disponible para las bacterias del suelo durante períodos que oscilan entre horas o días, o incluso más.

La digestión del material vegetal por los humanos o animales expone el ADN vegetal tanto a DNAsas vegetales, liberadas con la ruptura de las células vegetales, como a otras nucleasas en el tracto digestivo (de humanos y animales) o en el rumen (del ganado). Un solo estudio, sobre la supervivencia de ADN del bacteriófago M13 en heces de matón, observó que 2-4 % del ADN administrado era detectable hasta 7 horas después de la alimentación pero que la mayoría de este ADN era de bajo peso molecular (< 400 pb) y que ninguno se detectó en las bacterias intestinales (Schubbert *et al.*, 1994).

Toma del ADN y transformación

La toma del ADN por transformación es un proceso controlado genética y ambientalmente. Las células bacterianas transformables entran en un estadio de regulación fisiológica de competencia para tomar al ADN exógeno (Solomon & Grossman, 1996). Como las bacterias no expresan constitutivamente este tipo de competencia, el desarrollo de la misma constituye un factor limitante importante en el proceso de transformación natural. Sólo se han detectado unas pocas bacterias terrestres que expresan este tipo de competencia en condiciones normales de crecimiento, y el conocimiento sobre los factores ambientales que regulan esta competencia bacteriana es escaso (Nielsen *et al.*, 1997b).

En la mayoría de los estudios sobre transformación, las bacterias competentes han sido inoculadas en el sistema de suelo en estudio (Gallori *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1997b; Sikorski *et al.*, 1998) y sólo recientemente se ha demostrado que la competencia podría ser estimulada en bacterias no competentes del suelo luego de la adición de nutrientes específicos (Nielsen *et al.*, 2000). El sistema empleado en este último estudio consistió en *Acinetobacter* sp. BD413 pFG4nptII que contiene una deleción de 317 pb en el gen *nptII*. La restauración de esta deleción luego de la recombinación homóloga con ADN de plantas transgénicas que contenían el gen *nptII* sería detectable bajo la selección con kanamicina. Usando este sistema, se detectó la transformación con ADN de caña de azúcar transgénica en suelo estéril pero no en suelo no estéril. El umbral estimado de detección fue 10^{-10} a 10^{-11} , lo que implica una frecuencia de transformación aún menor en suelo no estéril. En condiciones más reales, la transformación no ocurriría vía recombinación homóloga (como se describió arriba) sino a través de recombinación ilegítima, una ocurrencia de mucha menor frecuencia.

La información científica existente, si bien no excluye la posibilidad de transformación natural de las bacterias del suelo en condiciones naturales, indica que, de ocurrir, es un evento de muy baja frecuencia, quizás en el orden de 10^{-17} (Schluter *et al.*, 1995). Análogamente, no existen informes de bacterias transformables naturalmente entre las especies de bacterias predominantes en el rumen o intestino de animales, aunque se han hecho numerosos intentos para detectar la transformación natural de las mismas (Salyers, 1997c).

Expresión de ADN heterólogo en bacterias

La expresión exitosa de elementos genéticos transferidos requiere de la presencia de arreglos apropiados de las secuencias regulatorias, como los promotores, y representa una fuerte barrera adicional para una TGH efectiva. Como norma general, las secuencias promotoras usadas para dirigir la expresión del transgén en plantas GM tienen muy poca actividad en células procariontes. Una excepción es el promotor del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor, usado frecuentemente, el cual es activo en *E. coli* (Assad & Signer, 1990). Más aún, la introducción de plásmidos enteros en plantas transgénicas por biobalística puede conducir a la presencia de secuencias expresables en bacterias, como el gen de resistencia a ampicilina *amp* (*bla*TEM1) localizado en pUC19. El potencial para introducir genes por ingeniería genética en el genoma de los cloroplastos, lo cual se ha propuesto como un método para controlar el flujo génico mediado por polen (Daniel *et al.*, 1998), introduciría secuencias regulatorias activas en bacterias dada la naturaleza procarionte de esta organela.

Consecuencias e impacto ambiental de la TGH

La probabilidad excesivamente baja de que ocurra la TGH no debería ser la única consideración a la hora de evaluar su potencial impacto para la salud humana y/o ambiental. Incluso los eventos muy poco probables pueden tener profundas implicancias. Las consecuencias de la TGH dependerán primariamente de dos factores: hasta qué grado haya una presión de selección favorable que les otorgue a las transformantes una ventaja adaptativa o la ocupación de un nuevo nicho, y su importancia dentro del contexto más amplio de conjunto (*pool*) de genes existentes. En el caso de una supuesta transformación de bacterias del suelo por ADN de plantas transgénicas, nuestro conocimiento actual de ecología microbiana no es capaz de predecir o cuantificar los factores en el suelo que afecten la selección de las transformantes que reciban los nuevos genes.

La transferencia de características de resistencia a antibióticos desde plantas transgénicas a bacterias, tanto del suelo como del intestino, ha sido citada frecuentemente como un posible resultado adverso de la TGH. Casi todos los organismos que producen resistencia a antibióticos, los cuales han sido aislados principalmente del suelo, contienen resistencia al antibiótico que ellos producen. Los genes que codifican para estas resistencias evolucionaron en paralelo con la maquinaria de biosíntesis del antibiótico y se han dispersado entre los microorganismos en el medioambiente a través del intercambio intergenérico de elementos genéticos móviles, como los plásmidos y los transposones.

Los genes de resistencia a antibióticos comúnmente usados en la investigación con ADN recombinante y en la producción de plantas transgénicas (por ej., cloranfenicol, estreptomina, ampicilina y kanamicina) son transportados en plásmidos transmisibles y ya se encuentran ampliamente dispersos en el medioambiente (Smalla et al. 1993), incluyendo las bacterias que causan enfermedades humanas. Generalmente, estos genes de resistencia tienen un espectro de acción muy estrecho y no están asociados con problemas hospitalarios actuales (Salers, 1997b). En el caso de la resistencia a kanamicina, el gen *nptII* comúnmente usado no confiere resistencia a antibióticos de uso terapéutico (oral).

Cuando se ingiere comida fresca, se adquieren grandes números de bacterias naturalmente resistentes a antibióticos (Salysers, 1997a; Smalla et al., 1997). Las actividades humanas, incluyendo la aplicación generalizada de antibióticos en veterinaria y medicina humana, han contribuido a la selección de poblaciones resistentes a antibióticos, lo cual ha sido demostrado en numerosos estudios (Levy, 1997; Tschape, 1994; Witte, 1997, 1998). Aún más, la existencia de bacterias resistentes a múltiples drogas no es exclusiva de ambientes hospitalarios, ya que han sido aisladas de muestras ambientales y de comida (Perreten et al., 1997), indicando un sustancial flujo de genes de resistencia y de bacterias resistentes entre distintos ambientes.

En este ejemplo, donde los determinantes genéticos que median la resistencia a un antibiótico determinado están ampliamente dispersas en las comunidades bacterianas naturales, la transferencia potencial del gen correspondiente desde las plantas transgénicas hacia las comunidades del suelo o del intestino no agregaría nada nuevo al conjunto de genes bacterianos. Las potenciales e incrementales consecuencias adversas de la TGH son, por lo tanto, insignificantes comparadas con el fondo genético existente de resistencia a antibióticos.

Conclusiones

Al evaluar las consecuencias de la TGH para el medioambiente y/o para la salud humana, la frecuencia de ocurrencia de este fenómeno natural no debería ser la única consideración para el evaluador de riesgo. Las propiedades de los genes introducidos, y la existencia de presión de selección favorable, en el caso de que estos genes se incorporen en otros organismos, deben ser también consideraciones de bioseguridad. Aunque el ejemplo de la posible TGH de características de resistencia a antibióticos desde las plantas hacia las bacterias demostró tanto la extremadamente baja probabilidad de ocurrencia como la falta de consecuencias significativas en caso de que ocurra, esto puede no ser así para otros genes. Sin embargo, también se deben moderar los cuidados al ser conscientes de que la TGH es un proceso natural de movimiento de genes entre especies responsable de efectuar cambio genético, y que los

genes introducidos en las plantas transgénicas no tienen mayor probabilidad de ser transferidos a otros organismos en comparación con otros genes vegetales.

Referencias

1. Assad, F.F. & Signer, E.R. (1990). Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 517-520.
2. Bergmans, H. (1993). Acceptability of the use of antibiotic resistance genes as marker genes in transgenic plants. P. 106-108. *In: OECD Report on the Scientific Approaches for the Assessment of Research Trials with Genetically Modified Plants*. April 6-7, 1992. Jouy-en-Josas.
3. Bertolla, F. & Simonet, P. (1999). Horizontal gene transfer in the environment: Natural transformation as a putative process for gene transfer between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* **150**, 375-384.
4. Blum, S.A.E., Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1997). Mechanisms of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in non-sterile soil. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 513-521.
5. Cho, Y., Qiu, Y.L., Kuhlman, P. & Palmer, J.D. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14244-9.
6. Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. & Lee, S.B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnol.* **16**, 345-348.
7. Droge, J., Puhler, A. & Selbitschka, W. (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology* **64**, 75-90.
8. Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Canto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C. & Stotzky, G. (1994). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**, 119-126.
9. Gebhard, F. & Smalla, K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**, 261-272.
10. Greaves, M.P. & Wilson, M.J. (1970). The degradation of nucleic acids and montmorillonite-nucleic acid complexes by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **2**, 257-268.
11. Hawtin, R.E., Arnold, K., Ayres, M.D., Zanotto, P.M., Howard, S.C., Gooday, G.W., Chappell, L.H., Kitts, P.A., King, L.A. & Possee, R.D. (1995). Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **212**, 673-685.
12. Jain, R., Rivera, M.C. & Lake, J.A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3801-3806.
13. Levy, S.B. (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. Ciba Foundation Symposium 207, S. 1-14, Wiley, Chichester.
14. Nielsen, K.M., van Weerelt, D.M., Berg, T.N., Bones, A.M., Hageler, A.N. & van Elsas, J.D. (1997a). Natural transformation and availability of transforming chromosomal DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1945-1952.
15. Nielsen, K.M., Bones, A.M. & van Elsas, J.D. (1997b). Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3972-3977.
16. Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K. & van Elsas, J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event? *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 79-103.
17. Nielsen, K.M., Smalla, K. & van Elsas, J.D. (2000a). Natural transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 206-212.
18. Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000b). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1237-1242.
19. Paget, E., Monrozier, L.J. & Simonet, P. (1992). Adsorption of DNA on clay minerals: Protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**, 31-40.
20. Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. & Teuber, M. (1997). Antibiotic resistance spread in food. *Nature* **389**, 801-802.
21. Pietramellar, G., Dal Canto, L., Vettori, C., Gallori, E. & Nannipieri, P. (1997). Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of DNA bound on clay minerals. *Soil Biol. Biochem.* **29**, 55-61.

22. Rissler, J. & Mellon, M. (1993). Perils amidst the promise. Ecological risks of transgenic crops in a global market. Union of Concerned Scientists, Cambridge, MA.
23. Robertson, H.M. & Lampe, D.J. (1995). Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 850-862.
24. Salyers, A. (1997a). Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 8-16. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.
25. Salyers, A. (1997b). Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 43-57. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.
26. Salyers, A. (1997c). Genetically Engineered Foods: Safety Issues Associated with Antibiotic Resistance Genes. A case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: Genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe. pp. 1-23.
27. Schluter, K. Futterer, J. & Potrykus, I. (1995). Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency. *Biotechnology* **13**, 1094-1098.
28. Schubbert, R., Lettman, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.* **242**, 495-504.
29. Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1998). Natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Micriobiol.* **144**, 569-576.
30. Smalla, K. van Overbeek, L.S., Pukall, R. & van Elsas, J.D. (1993). Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**, 47-58.
31. Smalla, K., Wellington, E. & van Elsas, J.D. (1997). Natural background of bacterial antibiotic resistance genes in the environment. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 8-16. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.
- Stewart, K.K., Food Composition and Analysis in the Assessment of the Safety of Food Produced by Biotechnology, *Food Technology*, **March 1992**, 103-107.
32. Solomon, J.M. & Grossman, A.D. (1996). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.* **12**, 150-155.
33. Tebbe, C.C. & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2657-2665.
34. Tschape, H. (1994). The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. *FEMS Microbiology Ecology* **15**, 23-32.
35. Veal, D.A., Stokes, H.W. & Daggard, G. (1992). Genetic exchange in natural microbial communities. *Adv. Microb. Ecol.* **12**, 383-430.
36. Wellington, E.M.H. & van Elsas, J.D. (Eds.)(1992). Genetic Interactions among Microorganisms in the Natural Environment. Pergamon Press. Oxford.
37. Witte, W. (1997). Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium 207, S. 61-75, Wiley, Chichester.
38. Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**, 996-997.



Capítulo 11 – Potencial de comportarse como maleza

Las malezas son consideradas un subgrupo de plantas que pueden considerarse como plagas. El término maleza es utilizado para describir una planta que es un perjuicio en ecosistemas controlados como las plantaciones agrícolas o forestales. En términos generales, las malezas son especies vegetales que se propagan fácilmente en áreas perturbadas o entre cultivos. El potencial de “comportarse como maleza” es una medida de la capacidad de la planta para colonizar exitosamente un ecosistema, especialmente cuando ello puede también conducir a desplazar otras especies. Baker (1965) describió las características ideales de las malezas, entre las cuales se incluyen las siguientes:

- Germinación discontinua y semillas de supervivencia prolongada,
- Rápido crecimiento de la plántula,
- Rápido crecimiento al estadio reproductivo,
- Producción continua y prolongada de semillas,
- Autocompatible, pero no obligatoriamente autopolinizante o apomíctica,
- En caso de fecundación cruzada, usa el viento o un polinizador no especializado,
- Alto número de semillas en condiciones favorables,
- Germinación y producción de semillas bajo un amplio rango de condiciones ambientales,
- Alta tolerancia o plasticidad a la variación climática y edáfica,
- Adaptaciones especiales para la dispersión,
- Buena competitividad lograda, por ejemplo, por aleloquímicos o por crecimiento opresivo, y
- En caso de ser perenne, tienen reproducción vegetativa vigorosa, friabilidad (*brittleness*) en los nudos inferiores o de los rizomas o tallos subterráneos, y capacidad de regeneración a partir tallos subterráneos o raíces dañadas.

Aunque las características de Baker han sido criticadas, no se ha definido ningún otro grupo de características ampliamente aceptadas por ecologistas (Williamson 1994), y no hay formulación claramente superior en este momento. Generalmente, la capacidad de comportarse como maleza depende de la ventaja selectiva de muchos genes que funcionan en combinación, que usualmente no están relacionados con los genes introducidos para propósitos agronómicos. Sin embargo, los caracteres que potencian la tolerancia a estreses ambientales tales como la sequía, el frío o la dormancia, tienen el potencial de incrementar la supervivencia y distribución de la planta en ecosistemas controlados o no controlados. Además, los caracteres que otorgan resistencia a estreses bióticos que juegan un rol significativo en la ecología de la planta (por ej., resistencia a insectos o patógenos) podrían permitir que la planta se convierta en persistente y/o invasiva dentro y fuera del ecosistema agrícola.

Para evaluar si una planta transgénica tiene alterado su potencial de comportarse como maleza, en comparación con su contraparte convencional, se debe examinar lo siguiente:

- Diseminación de la semilla
- Dormancia de la semilla
- Germinación de la semilla / supervivencia
- Competitividad
- Características agronómicas, por ej., tiempo a maduración, resistencia a enfermedades y plagas
- Tolerancia a estrés

CASO DE ESTUDIO MON810

Diseminación de la semilla

La diseminación de las plantas de maíz ocurre exclusivamente a través de la semilla. La característica introducida también puede dispersarse por el polen. El maíz no puede sobrevivir sin la asistencia humana debido a la selección pasada en su historia evolutiva (Galinat 1988). En consecuencia, la diseminación de la semilla de los granos individuales naturalmente no ocurre debido a la estructura de las espigas (mazorca) del maíz. La característica introducida, protección contra insectos, no tuvo influencia en la morfología reproductiva, y por lo tanto tampoco se esperan cambios en la diseminación de la semilla. MON810 sigue mostrando una inflorescencia femenina de múltiples filas (mazorca) sobre una espiga central firme (marlo) envuelta en chalas (brácteas u hojas modificadas).

No se han realizado ensayos para estudiar específicamente la producción o dispersión del polen. Sin embargo, basándose en el hecho de que la producción y viabilidad del polen [acorde a la medición de rendimiento y germinación (viabilidad del embrión) de la progenie] no se encuentran alteradas por la modificación genética, la frecuencia de fecundación cruzada es improbable que sea diferente para MON810 en comparación con otras variedades.

Germinación de la semilla

Se realizaron ensayos a campo de germinación de MON810 y de una línea control en seis localidades en 1994 a lo largo del centro-oeste de EE.UU. (Sanders *et al.*, 1995). No se encontraron diferencias significativas en la germinación media entre las líneas MON810 y control, y ambas líneas mostraron altas tasas de germinación en una variedad de condiciones ambientales (Tabla 1). Estos hallazgos avalan la conclusión de que no existen diferencias en la germinación o dormancia entre MON810 y su contraparte no modificada.

Tabla 1. Resultados de la germinación en campo para el maíz MON 810 y las líneas control

Línea	Germinación media	Rango
MON810	87,1%	71,1-94,3%
Control	90,6%	78,9-98,3%

Las observaciones desde 1993 demuestran que no existen diferencias en el vigor vegetativo o en la adaptación a factores de estrés ambiental incluyendo la sequía, el calor y la helada, entre MON810 y el control parental u otras líneas de maíz de similar fondo genético.

Conclusión

MON810 no tiene características que le confieran una mayor probabilidad de convertirse en maleza en ecosistemas controlados o no controlados, en comparación con las variedades convencionales de maíz.

Referencias

1. Baker, H. G. (1965). Characteristics and modes of origin of weeds. In: The genetics of colonizing species, pp. 147-168. Baker, H. G., and Stebbins, G. L. (eds.), Academic Press, New York.
2. Sanders, P.R., Elswick, E.N., Groth, M.E. & Ledesma, B.E. (1995). Evaluation of insect protected corn lines in 1994 U.S. field test locations. Study Number 94-01-39-01, MSL-14179, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43665502.
3. Williamson, M. (1994). Community response to transgenic plant release: Prediction from British experience of invasive plants and feral crop plants. *Molecular Ecology* **3**, 75-79.

Capítulo 12 – Efectos adversos secundarios y no intencionales



La evaluación del riesgo ambiental debe considerar las consecuencias no intencionales de la liberación al medioambiente de una planta transgénica, en particular porque esto puede tener algún impacto sobre las prácticas agrícolas y el agro-ecosistema. Esta discusión sobre los potenciales efectos no intencionales, o secundarios, se ilustra usando ejemplos que aborda la metodología de evaluación de riesgos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE.UU. para determinar los efectos adversos sobre los organismos no blanco. En el caso de los pesticidas para plantas, la intención del enfoque de la EPA es evaluar el riesgo potencial para las formas de vida silvestre terrestres, animales acuáticos, plantas, e insectos benéficos. Si se observan efectos nocivos en condiciones de laboratorio, se solicitan estudios a campo para evaluar la abundancia real de las especies no blanco en condiciones controladas y de experimentación. En el campo, los insectos, por ejemplo, están usualmente expuestos a cantidades de la toxina menores que en la dosis de prueba de laboratorio debido a la libre elección de dieta y otros factores ambientales en el marco de ese campo. La elección de organismos indicadores apropiados se basa en el potencial de exposición a campo a la nueva proteína expresada en las plantas transgénicas, lo cual depende de la especificidad de expresión en los distintos tejidos. En el caso de los cultivos Bt, donde la exposición a los rastros es una posibilidad, la EPA ha solicitado información sobre la toxicidad de las delta-endotoxinas para las aves (por ej., codorniz), peces, abejas y otros insectos benéficos (por ej., coccinélidos como los escarabajos “mariquitas” o “vaquitas”) e invertebrados del suelo (por ej., colémbolos y lombrices de tierra).

Organismos no blanco de prueba

Un organismo no blanco es cualquier planta, animal o microorganismo que sufre un impacto no intencional por parte de las plantas nuevas o transgénicas. La siguiente guía para la selección de organismos no blanco de prueba ha sido adaptada a partir de requisitos de información de la EPA de EE.UU para pesticidas proteicos de plantas:

1. Especies aviarias de prueba: codornices jóvenes (*Colinus virginianus*) o ánades reales (pato doméstico, *Anas platyrhynchos*) de 14 a 28 días de edad al comienzo del período de prueba.

2. Animales acuáticos: Esto es importante para plantas acuáticas que expresen genes Bt y que puedan tener aplicaciones en bosques, drenado de diques, bancos fluviales y cultivos sumergidos como el arroz. También es aplicable en el caso de cultivos que crecen cerca de cuerpos de agua.

Especies de peces de agua dulce: La guía de la EPA determina que se seleccionen las especies de prueba de una lista de especies recomendadas con la excepción del pez dorado (o “goldfish”, *Carassius auratus*): especies de agua templada - pez sol (“bluegill sunfish”, *Lepomis macrochirus*), bagre americano (“channel catfish”, *Ictalurus punctatus*) y pez de cabeza grande (“fathead minnow”, *Pimephales promelas*); especies de agua fría – trucha arco iris (“rainbow trout”, *Oncorhynchus mykiss*), trucha de arroyo o de la fontana (“brook trout”, *Salvelinus fontinalis*) y salmón coho (“coho salmon”, *Oncorhynchus kisutch*). Estas especies son organismos de prueba convenientes por varias razones importantes: i) se las utiliza frecuentemente para evaluar la toxicidad de pesticidas microbianos y químicos, ii) la EPA cuenta con importante información de base sobre estas especies, iii) se dispone de métodos estándar para su cuidado y manipulación, iv) se las encuentra ampliamente distribuidas, v) están generalmente disponibles, y vi) tienen cierta variedad de hábitos alimenticios y de requisitos de hábitat.

De ser apropiado, se debería considerar la posibilidad de realizar ensayos con especies representativas de la región geográfica o ecosistema donde se cultivará la planta pesticida. Se deberían evaluar, de ser apropiado, aquellas especies de peces que muestran probabilidad de alimentarse de insectos intoxicados o de tejido proveniente de la planta modificada (como el alimento para peces elaborado a partir de cultivos). A menos que existan otras consideraciones primordiales, se recomienda la trucha arco iris como la especie de prueba de agua dulce. Es un animal de prueba conveniente por ser parcialmente insectívoro.

Especies de invertebrados acuáticos: El tejido vegetal más indicado para los ensayos es el polen. Debido al amplio espectro filogenético que puede elegir el investigador, resulta difícil seleccionar el invertebrado acuático más apropiado. Se cuenta con una cantidad considerable de información de base sobre *Daphnia* (pulga de agua), crustáceo del suborden Cladocera, lo cual constituye una ventaja para fines comparativos. Además, *Daphnia* muestra un efecto de bioconcentración, el cual es resultado de su hábito alimenticio filtrador, y es una característica conveniente en términos de asegurarse que el animal de prueba ingiera el tejido que contiene la toxina. Tanto *Daphnia* como otros insectos acuáticos tienen la ventaja de presentar un ciclo de vida corto y son útiles para evaluar los efectos reproductivos.

3. Evaluación de insectos no blanco: La selección de las especies predatoras/parásitas a ser evaluadas debería considerar factores tales como la probabilidad de exposición a la proteína vegetal, proximidad filogenética de las especies de prueba con las especies blanco de la toxina, y relaciones similares.

La evaluación del potencial riesgo para insectos no blanco resulta complicada por un número de factores. Se espera que muchos de los pesticidas vegetales sean elegidos específicamente por su capacidad de controlar a los insectos plaga. En la mayoría de los casos, se puede asumir que el grupo de insectos no blanco en mayor riesgo estará cercanamente emparentado con las especies plaga. Si bien hay pocos insectos no blanco con demostrada importancia económica para los humanos, existen muchos insectos no blanco con un rol importante en los procesos ecológicos y que pueden beneficiar al hombre indirectamente.

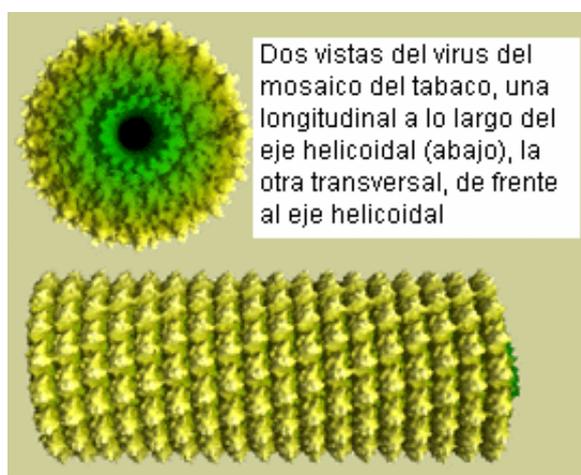
El rango de hospedadores es un factor importante en la evaluación de riesgo de una proteína pesticida producida en plantas. Un problema en este contexto es que la extrapolación, incluso a través de líneas de especies, suele no ser confiable. Por tal motivo, se deberían llevar a cabo ensayos con representantes de un cierto número de *taxa* de "insectos benéficos". La EPA recomienda que se realicen los ensayos con especies polinizadoras, como las abejas (*Apis mellifera*), y otras tres especies de insectos, que representen al menos dos de los siguientes grupos: dípteros parásitos, hemípteros predadores, coleópteros predadores, ácaros predadores, neurópteros predadores, himenópteros parásitos.

Los requisitos para evaluar los potenciales efectos tóxicos de las proteínas pesticidas vegetales sobre organismos del suelo representativos, como los colémbolos y las lombrices de tierra, se basaron originalmente en la posibilidad de la exposición a largo plazo de estos organismos al rastrojo incorporado al suelo o dejado sobre la superficie del suelo. (La EPA de EE.UU. no solicita dicha evaluación para el registro de pesticidas convencionales o productos en spray de *Bacillus thuringiensis*). Una de las razones de la EPA para solicitar las pruebas con invertebrados del suelo no blanco fue la preocupación de que los efectos adversos sobre estas especies causaran una acumulación de desechos vegetales en los campos de algodón. Desde ese entonces, la EPA ha descubierto que el uso a largo plazo en el suelo de insecticidas químicos altamente tóxicos, tales como aldicarb, terbufos, forate y carbofuranos, los cuales poseen efectos a largo plazo sobre las especies de invertebrados del suelo, no ha resultado en la acumulación de detrito vegetal en el suelo, basándose en información disponible sobre las prácticas agronómicas de rutina utilizadas en la actualidad. Algunos de estos materiales tienen una vida media de 10 o más años. Así, los cultivos que expresan proteínas pesticidas, que se espera que tengan menor impacto sobre estas especies que los pesticidas químicos altamente

tóxicos, no deberían resultar en una acumulación incrementada de desechos vegetales. Para avalar esta conclusión existe información que indica que la producción de la toxina Bt en plantas pesticidas cesa cuando la planta llega a senescencia en la mayoría de los cultivos de maíz Bt registrados, lo cual permite una cierta degradación de la proteína previa a la cosecha. Además, la información sobre el destino ambiental indica que para los cultivos de maíz Bt registrados hasta la actualidad sólo <1 to 90 gramos de la proteína Bt por acre^b entrarían en el suelo como resultado de la incorporación de las plantas Bt post-cosecha. Dado que se sabe que las proteínas se degradan rápidamente en el suelo, no se anticipa que el cultivo de plantas que contienen pesticidas proteicos presente potencial de acumulación significativa en el suelo y de riesgo para los organismos no blanco del suelo.

Otros efectos no intencionales: encapsidación heteróloga y recombinación

La siguiente discusión de los potenciales efectos secundarios de las plantas transgénicas resistentes a virus (por ejemplo: alteraciones fenotípicas y recombinación viral) ha sido incluida como un ejemplo de otro tipo de efecto no intencional.



Desde el primer reporte de plantas transgénicas que expresan resistencia al virus de mosaico del tabaco, producido por Powell-Abel *et al.* en 1986, han sido desarrollados numerosos cultivos transgénicos tolerantes o resistentes a un amplio rango de virus (Beachy 1997). Estas plantas representan la primera aplicación del concepto de resistencia derivada del patógeno (Sanford & Johnston, 1985), en las cuales genes virales que codifican para proteínas de la cápside (CP), replicasas, proteínas defectivas de movimiento, proteasas, o componentes auxiliares (Lomonosoff, 1995), han sido introducidas en el genoma de la planta. Mayoritariamente, la forma más común de resistencia derivada del patógeno desarrollada por ingeniería genética es la resistencia mediada por CP, que ha sido usada para conferir resistencia a virus de ARN de al menos 13 géneros, que incluyen 23 especies distintas de virus (Grumet 1995).

Las plantas transgénicas resistentes a virus y a enfermedades ofrecen muchos beneficios agronómicos y ecológicos potenciales. Este es claramente el caso cuando no se han identificado los correspondientes genes de resistencia naturales del hospedador o cuando no es posible trasladar estos caracteres a los cultivos comerciales. Además existe la posibilidad de reducir el uso de pesticidas para controlar los insectos vectores de virus patógenos. Junto con estos beneficios existen riesgos ecológicos potenciales que deben ser considerados. Estos riesgos que se relacionan con la posible interacción entre productos del transgén viral, ya sea el ARN o la proteína, y un virus infectivo, incluyen: sinergismo, encapsidación heteróloga, y recombinación (Tepfer, 1993; Robinson, 1996; Aaziz & Tepfer, 1999). Dependiendo de la

^b NT: 1 acre = 0,405 hectáreas

planta hospedadora, también deben considerarse las consecuencias del pasaje de la característica de resistencia viral a especies salvajes relacionadas por medio de cruzamiento.

Efectos fenotípicos no persistentes: Existen dos preocupaciones relacionadas con la alteración fenotípica. La primera está basada en la posibilidad de una interacción sinérgica adversa entre el ARN o la proteína producidos por un transgén y un virus infectivo heterólogo (por ejemplo: un virus diferente al usado en la construcción de la planta transgénica, que también infecta a la planta hospedadora) tal que produzca un aumento en la severidad de los síntomas causados por la infección con el virus heterólogo. Han sido descritas interacciones de sinergismo entre virus coinfectantes de una planta hospedadora no transgénica para varias combinaciones de virus. El primer ejemplo descrito, y el mejor estudiado, es con el virus X (PVX) y el virus Y (PVY), ambos de la papa (Rochow & Ross, 1955). El mecanismo subyacente de estos efectos sinérgicos no es bien conocido. Se han ideado sistemas experimentales para identificar los productos de genes responsables creando plantas transgénicas que expresan varias porciones del genoma del potivirus y examinando la expresión de síntomas luego de una inoculación con PVX. Basado en estos estudios, los 3.544 nucleótidos del extremo 5' terminal del genoma de PVY, que codifica para la proteasa-1 (P1), el componente auxiliador de la proteasa (HC-Pro) y la proteína-3 (P3), son esenciales para la expresión de los efectos sinérgicos.

La segunda preocupación se basa en la posibilidad de encapsidación heteróloga (también llamada transencapsidación), proceso por el cual el genoma de ARN (o ADN) de un virus heterólogo infectivo puede ser encapsidado por la proteína de cubierta codificada por el transgén. La encapsidación heteróloga puede resultar en una alteración por única vez, ya sea en el modo de transmisión o en el rango de hospedador del invasor. La encapsidación heteróloga, igualmente llamada mezcla fenotípica, también es posible en condiciones de infección mixta con diferentes virus, como ha sido demostrado para el luteovirus del enanismo amarillo de la cebada (Mathews, 1991) y miembros de los grupos potivirus (Bourdin & Lecoq, 1991) y tombusvirus (Dalmay *et al.*, 1992). Aunque la infección viral múltiple es común en árboles y en plantas crecidas en el campo (Abdalla *et al.*, 1985; Falk & Bruening, 1994), pocas transencapsidaciones han sido reportadas en situaciones de campo que involucraran transmisión viral por insectos (Falk *et al.*, 1995). La encapsidación heteróloga ha sido también demostrada en plantas transgénicas que expresan la CP viral (Osburn *et al.*, 1990; Dalmay *et al.*, 1992; Holt & Beachy, 1992). Por ejemplo, Lecoq *et al.* (1993) mostraron que cuando se desafiaron plantas que expresaban un transgén de CP de una cepa transmisible por áfido del Virus del Mosaico Amarillo del Zapallito con una cepa no transmisible por áfido (defectiva en factor CP de transmisión por no áfidos), se pudo detectar una cepa heteróloga transmisible por áfido.

Tanto el sinergismo como la transencapsidación son efectos fenotípicos de corto plazo que se restringen a la vecindad del cultivo transgénico y desaparecerán sin efectos persistentes en el medioambiente si la plantación de cultivos transgénicos es detenida. Con respecto a la encapsidación heteróloga, “no es un problema, porque está limitada a una única transferencia, por ejemplo, una vez que el genoma encapsidado de forma heteróloga es introducido dentro de un nuevo hospedador, revierte utilizando su propia CP” (Henry *et al.*, 1995). En términos generales, no se espera que los efectos del sinergismo ni los de la transencapsidación resulten más serios que los impactos que puedan ocurrir en infecciones múltiples de cultivos susceptibles.

Recombinación viral: La recombinación viral ha sido propuesta como el riesgo más significativo asociado a plantas transgénicas resistentes a virus. Antes de dirigirnos directamente a este tema, es importante examinar la ocurrencia y relevancia de la recombinación de ARN en infecciones mixtas de virus en plantas no transgénicas. La recombinación de ARN fue observada primeramente en coinfecciones de distintas cepas de poliovirus portadoras de una única mutación (Hirst, 1962; Ledinko, 1963), y desde entonces se ha documentado para un número creciente de virus de ARN. Tanto los análisis filogenéticos de secuencias nucleotídicas virales como los ensayos de laboratorio utilizando variantes virales no

replicativas (virus animales) o defectivas de movimiento (virus de plantas), en los cuales el defecto funcional puede ser restaurado a través de la recombinación del ARN, han sido utilizados como evidencia de la recombinación del ARN (Tabla 1). La replicación del genoma en los virus de ARN involucra a una ARN polimerasa dependiente de ARN codificada por el virus (RdRp), y el modelo más aceptado para la recombinación de ARN es el mecanismo de intercambio de molde mediado por la RdRp. En este modelo, la recombinación del ARN ocurre durante la síntesis del ARN, si la RdRp se detiene (sobre la hebra dadora) y cambia a otro sitio del mismo molde o a otra hebra (hebra aceptora) para reasumir la síntesis del ARN naciente (Cooper *et al.*, 1974; Nagy & Simon, 1997).

Tabla 1. Evidencias directas de laboratorio de recombinación en virus ARN¹

Grupo de virus	Virus	Referencia ²
Animales		
Picornavirus	Virus de la polio	Hirst (1962)
	Virus de la fiebre aftosa	McCahon et al (1985)
Coronavirus	Virus de la hepatitis murina	Lai et al (1985)
	Virus de la bronquitis infecciosa	Kottier et al (1995)
Alfavirus	Virus Sindbis	Weiss & Schlesinger (1991)
Ortomixovirus	Virus de la influenza	Bergmann et al (1992)
Nodavirus	Virus Flock house	Li & Ball (1993)
Vegetales		
Bromovirus	Virus del mosaico de Bromus	Bujarski & Kaesberg (1986)
	Virus del moteado clorótico del caupí	Allison et al (1990)
Carmovirus	Virus de la hoja arrugada del tulipán	Cascone et al (1990)
Tobamovirus	Virus del mosaico del tabaco	Beck & Dawson (1990)
Alfamovirus	Virus del mosaico de la alfalfa	van der Kuyl et al (1991)
Tombusvirus	Virus de la necrosis del pepino, Virus del enanismo ramificado del tomate (ARN DI) ³	White & Morris (1004)
Cucumovirus	Virus del mosaico del pepino, virus de la aspermia del tomate	Fernández-Cuatero et al (1994)
Potyvirus	Virus del mosaico amarillo del zucchini	Gal-On et al (1998)
Bacterianos		
	Qbeta	Munishkin et al (1988)
	phi6	Onodera et al (1994)

1. Reproducido de Aaziz & Tepfer (1999)

2. Sólo se cita la primera referencia

3. ARN DI, ARN Defectivo Interferente

Es prácticamente imposible estimar la frecuencia de recombinación de ARN en infecciones mixtas de virus salvajes. Aunque los estudios de laboratorio realizados bajo condiciones de alta presión de selección han demostrado que la actividad de virus mutantes funcionalmente defectivos puede restaurarse a través de la recombinación de ARN con el mismo virus salvaje o con otro cercanamente relacionado, no se han publicado datos sobre recombinación de ARN entre virus salvajes coinfectivos. La recombinación del ARN requiere que los dos virus realicen la replicación del ARN al mismo tiempo y en la misma localización subcelular, condiciones que son difíciles de alcanzar. Esto se ilustra con el virus mosaico del pepino (CMV) y el virus de la aspermia del tomate (TAV), dos miembros del grupo cucumovirus, con los cuales la coinfección exitosa de plantas de tabaco es la excepción pero no la regla, ya que generalmente CMV excluye a TAV (Stackey & Francki, 1990).

En sistemas experimentales, conceptualmente similares a los desarrollados para demostrar la recombinación de ARN entre virus, se ha reportado la recombinación de ARN entre el transcrita de un transgén y el ARN viral infectivo para el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el virus moteado clorótico del caupí (CCMV) y el virus del enanismo ramificado del

tomate (TBSV), (Borja et al., 1999). Por ejemplo, la inoculación de *Brassica napus* transgénica que expresa el marco de lectura abierto VI del CaMV, gen que codifica para una proteína de movimiento necesaria para la infección sistémica del virus, con una cepa viral defectiva para la proteína de movimiento, dio como resultado la generación de partículas de CaMV recombinantes (Gal et al., 1992). De la misma manera, Greene y Allison (1994, 1996) pudieron demostrar la recombinación de ARN entre un transgén que codifica para la porción 3' terminal de la proteína de cápside del CCMV y un aislamiento de CCMV carente de dicha región del gen de proteína de cápside.

Dado que puede ocurrir la recombinación del ARN, tanto entre virus en infecciones mixtas de plantas no transgénicas como entre un transgén y un virus que infecta una planta transgénica, la pregunta esencial de la bioseguridad es: ¿la recombinación entre el ARNm de un transgén y los virus que infecten a la planta transgénica conducirá a la creación de cepas nuevas con propiedades más perjudiciales? Hasta la fecha, no hay evidencia empírica que avale este punto de argumentación. Cuando los aislamientos de CCMV recombinantes fueron evaluados sobre un rango de plantas hospedadoras, cuatro de siete mostraron síntomas (Allison et al., 1997), pero ninguna de ellas resultó más apta que las cepas parentales cuando se inocularon con el virus salvaje (Allison et al., 1999). Otros ensayos que examinaron la sintomatología de virus recombinantes, creados *in vitro* por intercambio de segmentos de ARN entre diferentes cepas o entre diferentes virus emparentados, también mostró cambios considerables ocasionalmente (Ding et al., 1996; Salanki et al., 1997; Carrere et al., 1999). Sin embargo, estos estudios no investigaron plenamente la capacidad adaptativa de los virus recombinantes en comparación con la de las cepas parentales.

A pesar de que existe escasa evidencia experimental, hasta la fecha no existen indicios de que la naturaleza de los recombinantes virales que se originan de la recombinación de ARN en infecciones de plantas no transgénicas por mezcla de virus sea distinta de las que resulten posibles en plantas transgénicas infectadas por un solo virus. Si este fuera el caso, es razonable concluir que las plantas que expresan secuencias virales no presenten nuevos o mayores riesgos en comparación con lo que existe naturalmente en un “mundo no transgénico”.

CASO DE ESTUDIO MON810

Potencial de comportarse como planta plaga

Una planta puede ser considerada una plaga pero no una maleza. Por ejemplo, una planta que produce una sustancia alelopática puede ser considerada una plaga si la toxina que produce tiene efectos ambientales no deseados. Las plantas transgénicas que expresan nuevas toxinas o potenciales alérgenos deben ser evaluadas en forma acorde.

No existe evidencia que indique que MON810 tenga algún potencial de planta plaga alterado en comparación con su contraparte no transformada.

Efectos sobre organismos no blanco

Existe información exhaustiva sobre la falta de efectos no deseados obtenidos a partir de preparaciones microbianas de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* (*B.t.k.*) que contienen la proteína Cry1Ab. La proteína Cry1Ab de longitud completa codificada por el gen *cry1Ab* usado para producir MON810, y el núcleo proteico resistente a tripsina con actividad insecticida (HD-1) producido en estas plantas, son idénticos a las proteínas Cry1Ab de longitud completa y sus núcleos resistentes a tripsina contenidos en las formulaciones microbianas comerciales que han sido utilizadas en forma segura por más de 30 años (Lee et al., 1995^a; EPA, 1988). Las proteínas de *B.t.k.* tienen una selectividad extrema por los insectos lepidópteros (MacIntosh et al., 1990; Klausner, 1984; Aronson et al., 1986; Dulmage, 1981; Whitely & Schnepf, 1986), se unen específicamente a receptores presentes en el intestino medio de estos insectos (Wolfersberger et al., 1986; Hofmann et al., 1988a; Hofmann et al., 1988b; Van Rie et al., 1989; Van Rie et al., 1990) y no tienen efectos perjudiciales sobre otros insectos benéficos o no

blanco (Flexner *et al.*, 1986; Krieg & Langenbruch, 1981; Cantwell *et al.*, 1972; EPA, 1988; Vinson, 1989; Mehn & Cozzi, 1989).

Estudios a campo: Estados Unidos

Se realizaron ensayos a campo en EE.UU. desde 1993 hasta 1995 para evaluar el impacto del maíz protegido contra insectos sobre artrópodos benéficos. Se compararon líneas endocriadas de maíz e híbridos que expresan la proteína Cry1Ab con sus contrapartes no transformadas para evaluar la abundancia relativa de artrópodos benéficos.

Métodos

Ensayos de 1993: Se plantaron cuatro líneas endocriadas de maíz en una localidad en Iowa y en una en Nebraska (8 surcos/línea/localidad): líneas MON801 y 523-06-1, protegidas contra insectos, y dos líneas endocriadas no transgénicas. Se realizó un muestreo visual no destructivo para evaluar el número de artrópodos benéficos clave. Se inspeccionaron las plantas para detectar la presencia de insectos de interés. Se hicieron las cuentas sobre la base de 5 plantas/surco en cada fecha de muestreo.

Ensayos de 1994: Se evaluaron cuatro eventos de transformación: 523-06-1, 546-09-1, MON809 y MON801, en dos localidades en Iowa. Se plantó un total de 12 líneas en la primera localidad y 8 líneas en la segunda con cuatro réplicas por localidad. Los protocolos de muestreo fueron los mismos que en 1993.

Ensayos de 1995: Los sitios de ensayos se establecieron en dos localidades: Kentucky (6 líneas protegidas contra insectos, 6 controles) y Iowa (MON810 y control). El muestreo visual se realizó tres veces.

Resultados

1993: Los adultos de *O. insidiosus* fueron los únicos predadores en abundancia consistente y por lo tanto fueron la única especie evaluada. No se hicieron verdaderas réplicas, y por lo tanto no se realizaron análisis estadísticos. La tendencia observada indicó que no había efectos adversos sobre el número de predadores debido a la presencia de la proteína Cry1Ab.

1994: Los datos se presentan en la Tabla 2. Se observó una diferencia estadística significativa en una línea en una fecha de muestreo, cuando el número de predadores fue mayor en el híbrido protegido contra insectos en comparación con su contraparte no transformada.

Tabla 2. Conteo de *Orius* adultos en dos ensayos de campo en Iowa, 1994

Híbrido	Sitio 1		Sitio 2	
	5 Julio	27 Julio	5 Julio	27 Julio
Híbrido H	11,25	42,25	29,0	7,5
Híbrido H/MON 809	9,25	31,25	37,0	8,0
Híbrido H/546-09-1	7,5	31,75	40,25	7,25
Híbrido H/MON 801	13,25	42,25	36,75	7,0
Híbrido G	9,75	42,5	53,5	6,25
Híbrido G/523-06-1	9,5	39,0	39,25	7,0
Híbrido G/546-09-1	10,25	36,0	48,5	3,75
Híbrido H/MON 801	7,75	37,75	45,25	7,25
Híbrido D	12,0	33,0	NP*	NP
Híbrido D/523-06-1	11,75	37,75	NP	NP
Híbrido D/546-09-1	17,25	41,0	NP	NP
Híbrido D/MON 801	14,5	40,75	NP	NP
MDS**	4,2	12,4	15,2	4,3

*No plantado, ** Menor Diferencia Significativa

1995: Los resultados de Kentucky se muestran en la Tabla 3, y los de Iowa, en la Tabla 4. En la localidad de Kentucky se registraron tres comparaciones significativas en el número medio de adultos de *Orius*, pero en términos generales, el número de *Orius* resultó comparable entre las líneas transformadas y no transformadas. En Iowa, se observaron diferencias en la abundancia de predadores en cada momento de muestreo, pero se observaron diferencias entre las líneas de maíz protegido contra insectos y las de maíz no transformado.

Tabla 3. Número promedio de *Orius insidiosus* por planta en ensayos de campo en Kentucky, 1995.

Híbrido	11 Julio	20 Julio	7 Agosto
Híbrido I	5,1	8,5	2,5
Híbrido I/MON 801	4,7	12,0	2,8
Híbrido D	4,4	10,8	2,4
Híbrido D/MON 801	4,5	14,8	2,6
Híbrido J	6,6	17,4	2,8
Híbrido J/MON 809	7,0	13,4	3,3
Híbrido A	6,3	9,5	1,2
Híbrido A/654-01-1	8,6	10,6	2,3
Híbrido H	4,5	12,5	2,8
Híbrido H/MON 801	4,1	15,0	2,6
Híbrido #1	6,1	8,8	2,7
Híbrido #1/654-02-1	6,2	11,1	2,9
MDS*	2,3	2,7	1,0

* Menor Diferencia Significativa

Tabla 4. Promedio del número de predadores totales y masas de huevos del barrenador europeo del maíz (BEM) por planta en ensayos de campo en Iowa, 1995.¹

Línea	1 Agosto < dispersión del polen	6 Agosto dispersión del polen	18 Agosto > dispersión del polen
No transgénico	2,9/0,1	3,7/0,1	4,5/0,6
MON 810	3,2/0,1	4,9/0,3	6,2/0,8

1. Los valores se expresan como el número de predadores/masas de huevos de BEM.

Conclusión

Los resultados observados en los ensayos a campo desde 1993 hasta 1995 demostraron que el maíz que expresa la proteína Cry1Ab no tuvo efectos directos ni indirectos sobre las especies de artrópodos benéficos estudiadas. Además, el conteo de insectos en Iowa en 1995 mostró que el maíz protegido contra insectos no tuvo efectos sobre las arañas, los coccinélidos, las crisopas y los nábidos, que se sabe que son predadores importantes del barrenador europeo del maíz y de otras plagas del maíz económicamente importantes.

Estudios a campo: Francia

En 1995 se establecieron ensayos de eficacia en dos localidades en Francia para evaluar el impacto de MON810 sobre las poblaciones de artrópodos benéficos en comparación con su contraparte no transformada (MON810/Bt-) con y sin insecticida.

Métodos

El ensayo fue establecido como un diseño factorial completo con presencia/ausencia de tres factores: proteína Cry1Ab, inoculación con el barrenador europeo, y spray de insecticida (delta-metrina a 20 g/ha). Además de las evaluaciones de rendimiento, se evaluó el número de artrópodos benéficos en 10 plantas por cada terreno. Para asegurar el desarrollo de la infección por el barrenador europeo, la mitad de los terrenos fue inoculada con el insecto plaga.

Resultados

No hubo diferencias significativas en las poblaciones de artrópodos benéficos cuando se compararon los terrenos de MON810 y MON810/Bt- sin tratar (Tabla 5). Se observaron diferencias significativas en las poblaciones de artrópodos benéficos cuando se comparó MON810 con MON810/Bt- tratado con insecticida (Tabla 5).

Tabla 5. Artrópodos benéficos (promedio/30plantas) observados sobre MON 810, MON 810/Bt- (sin insecticida) y MON 810/Bt- (con insecticida).

Lugar	Tratamiento		
	MON 810	MON 810/Bt- sin insecticida	MON 810/Bt- con insecticida
Viraz	18,5	16	6
Pau	11,8	14,8	3,2

Conclusión

La proteína Cry1Ab presente en MON810 no mostró impacto adverso apreciable en las poblaciones de artrópodos benéficos.

Estudios de laboratorio

La producción de proteínas insecticidas dentro de matrices vegetales puede prolongar su persistencia en el medioambiente e incrementar la biodisponibilidad de las proteínas para ambos grupos de invertebrados blanco y no blanco (Jepson *et al.*, 1994). El núcleo resistente a tripsina de Cry1Ab (HD-1), en el maíz resistente al barrenador europeo, está presente en el tejido vegetal que queda en el suelo luego de la cosecha (rastrajo). El rastrajo del maíz típicamente es introducido en el suelo por la labranza pero también puede quedar sobre la superficie del suelo hasta el próximo año (sistema de labranza cero o siembra directa). Los resultados de un estudio, realizado para evaluar el destino ambiental (disipación) de la proteína B.t.k. HD-1 en el rastrajo de maíz, determinaron que la proteína B.t.k. HD-1, como componente del rastrajo de maíz resistente al barrenador europeo, se disipará fácilmente en la superficie o dentro del suelo (ver Apéndice 2).

Antes de la degradación final, la proteína Cry1Ab puede ser consumida por invertebrados no blanco del suelo tales como las lombrices de tierra y los colémbolos, que son componentes críticos de los procesos de descomposición del suelo (Calow, 1993). Así mismo, se requieren ensayos de toxicidad en insectos no blanco para evaluar los posibles riesgos ecológicos dados por la exposición a las nuevas variedades de los cultivos (Urban y Cook, 1986). Como las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* son biológicamente activas sólo luego de ser ingeridas y unirse a los receptores específicos del intestino medio de los insectos susceptibles, se requieren ensayos de dieta alimentaria para estudiar la respuesta toxicológica de las especies de insecto no blanco.

Debido a que la proteína Cry1Ab expresada en MON810 es rápidamente degradada por enzimas proteolíticas digestivas luego de la ingestión, sus efectos toxicológicos fueron evaluados usando el núcleo proteico resistente a tripsina (HD-1) de la proteína Cry1Ab expresada en bacterias y digerida con tripsina. El gen *cry1Ab* nativo de longitud completa fue introducido en *E. coli* y la proteína Cry1Ab expresada fue sometida a digestión por tripsina, purificada, caracterizada y utilizada para estudios de evaluación de seguridad de insectos

benéficos y mamíferos. Se estableció la equivalencia estructural y funcional del núcleo resistente a tripsina HD-1 expresado en *E. coli* y la Cry1Ab expresada en las plantas transgénicas MON810, a través de un conjunto riguroso de criterios que incluyeron el peso molecular, la inmunoreactividad, y la actividad insecticida (ver material expresado/efecto).

Los siguientes son breves resúmenes de los ensayos de dieta alimentaria de especies indicadoras no blanco clave. Los detalles de cada ensayo, con la excepción de himenópteros parasíticos y los escarabajos “mariquitas”, se presentan en el Apéndice 3.

Larvas y adultos de abejas: Estos estudios se realizaron para evaluar la seguridad del núcleo proteico resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab para las larvas y los adultos de las abejas mieleras (*Apis mellifera* L.), un insecto polinizador benéfico. Para estos estudios se usó una dosis de riesgo máxima. La concentración nominal máxima de la proteína Cry1Ab evaluada fue 10 veces superior al valor estimado de Cry1Ab necesaria para causar la muerte del 50% (DL50) de varios lepidópteros plaga blanco (MacIntosh *et al.*, 1990). No se observaron diferencias entre los tratamientos, y la DL50 para la proteína Cry1Ab en abejas adultas y larvas fue mayor a 20 ppm, la mayor dosis ensayada. La concentración en la cual no se observaron efectos fue de 20 ppm (Maggi & Sims, 1994a, 1994b; Sims, 1994).

Crisopa verde: La crisopa verde (*Chrysopa carnea*) es un insecto predador benéfico que se encuentra comúnmente en el maíz y otras plantas cultivadas. No hubo evidencia de que las larvas de crisopa verde fueran afectadas adversamente cuando se las alimentó con huevos de pollilas recubiertos con una concentración nominal de proteína Cry1Ab de 16,7 ppm durante siete días. Bajo las condiciones de estudio, la DL50 fue mayor a 16,7 ppm de proteína Cry1Ab, la dosis mayor ensayada (Hoxter & Lynn, 1992a).

Himenópteros parasíticos: Se realizó un estudio para evaluar la seguridad del núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab en el himenóptero parasítico *Brachymeria intermedia*, un parásito benéfico de la mosca casera (*Musca domestica*). Los himenópteros parasíticos expuestos al núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab en una concentración de 20ppm en una solución de miel/agua durante treinta días no mostraron mortalidad relacionada al tratamiento ni signos de toxicidad. La DL50 de proteína Cry1Ab en el himenóptero parasítico fue superior a 20 ppm, la mayor dosis ensayada. La concentración en la cual no se observaron efectos fue de 20 ppm (Hoxter & Lynn, 1992b).

Escarabajos mariquitas (“vaquitas”): El escarabajo mariquita (*Hippodamia convergens*) es un insecto predador benéfico que se alimenta de áfidos y otros insectos de plantas que se encuentran comúnmente sobre las hojas y tallos de las malezas y plantas cultivadas. Se expuso al escarabajo mariquita al núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab a una concentración de 20 ppm en una solución de miel/agua durante nueve días y no mostró mortalidad relacionada al tratamiento ni signos de toxicidad. La DL50 de proteína Cry1Ab para el escarabajo mariquita fue superior a 20 ppm, la mayor dosis ensayada. La concentración en la cual no se observaron efectos fue de 20 ppm (Hoxter & Lynn, 1992c).

Daphnia: Para el cladocero *Daphnia magna* (pulga de agua), se realizó un estudio de evaluación de la toxicidad aguda del polen de maíz que contiene proteína Cry1Ab durante un período de exposición de 48 horas bajo condiciones de prueba de estática-renovación. Los dáfnidos son representantes de un grupo importante de invertebrados acuáticos. El valor estimado de DL50 de 48 ha para *D. magna* expuesta a la proteína Cry1Ab en el polen de maíz fue >100 mg polen de prueba por litro. No se observaron efectos relacionados al tratamiento en la concentración límite de 100 mg de polen de prueba/l.

Lombrices de tierra: El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de la proteína insecticida Cry1Ab administrada a lombrices de tierra durante una exposición de 14 días en un sustrato de suelo artificial. Se determinó que el valor estimado de DL50 de 14 días para las lombrices expuestas a la proteína insecticida Cry1Ab era superior a 200 mg/kg de suelo seco, la única concentración ensayada. La concentración en la cual no se observaron efectos fue 200 mg/kg de suelo seco.

Colémbolos: El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la proteína Cry1Ab expresada en planta sobre los colémbolos, que son invertebrados que habitan en el suelo y que juegan un rol importante en el ecosistema del suelo, ya que se alimentan de materiales vegetales en descomposición. Los colémbolos podrían estar expuestos a la proteína Cry1Ab presente en el rastrojo de maíz. Los resultados de estos estudios indican que, incluso a dosis de tratamientos muy elevadas, los colémbolos no fueron afectados por la exposición crónica a Cry1Ab de las plantas.

Codornices: El objetivo de este estudio fue evaluar la inocuidad de los derivados del maíz resistente al barrenador europeo de la línea MON80187 cuando se los utiliza para alimentar codornices (las aves se pueden alimentar de semillas de maíz que quedan sueltas en el campo luego de la cosecha). No se observó mortalidad en las aves alimentadas con hasta 10% p/p (nominal 100.000 ppm) de MON 80187 en la dieta. En base a los parámetros medidos, la inocuidad del alimento derivado de la línea de maíz resistente al barrenador europeo (MON80187) resultó comparable con la de la línea control (MON80087) cuando se la utilizó en la dieta de las codornices.

Referencias

1. Aaziz, R. & Tepfer, M. (1999). Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *Journal of General Virology* **80**, 1339-1346.
2. Abdalla, O. A., Desjardins, P. R. & Dodds, J. A. (1985). Survey of pepper viruses in California by the ELISA technique. *Phytopathology* **75**, 1311.
3. Allison, R.F., Thompson, C. & Ahlquist, P. (1990). Regeneration of a functional RNA virus genome by recombination between deletion mutants and requirement for cowpea chlorotic mottle virus 3a and coat genes for systemic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1820-1824.
4. Allison, R.F., Greene, A.E. & Schneider, W.L. (1997). Significance of RNA recombination in capsid-protein-mediated virus-resistant transgenic plants. In: "Virus-Resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact", pp. 40-44. Edited by M. Tepfer & E. Balazs. Versailles & Heidelberg: INRA & Springer-Verlag.
5. Allison, R.F., Schneider, W.L. & Deng, M. (1999). Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. In: "Proceedings of the 5th International Symposium on Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms", Braunschweig. Edited by J. Schiemann & R. Casper.
6. Aronson, A.I., Backman, W. & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**, 1-24.
7. Beachy, R.N. (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 215-220.
8. Beck, D.L. & Dawson, W.O. (1990). Deletion of repeated sequences from tobacco mosaic virus mutants with two coat protein genes. *Virology* **177**, 462-469.
9. Bergmann, M., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (1992). Transfection-mediated recombination of influenza A virus. *Journal of Virology* **66**, 7576-7580.
10. Borja, M., Rubio, T., Scholthof, H.B. & Jackson, A.O. (1999). Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 153-162.
11. Bourdin, D. & Lecoq, H. (1991). Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a nonaphid transmissible isolate from mixed infection. *Phytopathology* **28**, 1459-1464.
12. Bujarski, J.J. & Kaesberg, P. (1986). Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature* **321**, 528-531.
13. Calow, P. (ed.) (1993). *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publishing, London. 478 p.
14. Cantwell, G.E., Lehnert, T. & Fowler, J. 1972. Are biological insecticides harmful to the honey bees. *Am. Bee J.* **112**, 294-296.
15. Carrere, I., Tepfer, M., Jacquemond, M. (1999). Recombinants of cucumber mosaic virus (CMV): determinants of host range and symptomatology. *Arch Virol.* **144(2)**, 365-79.
16. Cascone, P.J., Carpenter, C.D., Li, X.H. & Simon, A.E. (1990). Recombination between satellite RNAs of turnip crinkle virus. *EMBO Journal* **9**, 1709-1715.

17. Cooper, P.D., Steiner-Pryor, A., Scotti, P.D. & DeLong, D. (1974). On the nature of poliovirus genetic recombinants. *Journal of General Virology* **23**, 41-49.
18. Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J., & Russo, M. (1992). Replication and movement of a coat protein mutant of cymbidium ringspot tobravirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 379-383.
19. Ding, S.W., Shi, B.J., Li, W.X. & Symons R.H. (1996). An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93(15)**, 7470-4.
20. Dulmage, H.T. 1981. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. (ed. Burges, H.D.) pp. 193-222. Academic Press, London.
21. Environmental Protection Agency (EPA). (1988). Guidance for the re-registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. NTIS PB 89-164198.
22. Falk, B. W. & Bruening, G. (1994). Will transgenic crops generate new viruses and new diseases. *Science* **263**, 1395-1396.
23. Falk, B.W., Passmore, B.K., Watson, M.T. & Chin, L.-S. (1995). The specificity and significance of heterologous encapsidation of virus and virus-like RNAs. In: "Biotechnology and Plant Protection: Viral pathogenesis and disease resistance". Bills, D.D. & Kung, S.-D. (eds.). World Scientific, Singapore, pp. 391-415.
24. Fernandez-Cuartero, B., Burgyan, J., Aranda, M.A., Salanki, K., Moriones, E. & Garcia-Arenal, F. (1994). Increase in the relative fitness of a plant virus RNA associated with its recombinant nature. *Virology* **203**, 373-377.
25. Flexner, J.L., Lighthart, B. & Croft, B.A. (1986). The effects of microbial pesticides on non-target beneficial arthropods. *Agric. Ecosys. Environ.* **16**, 203-254.
26. Gal, S., Pisan, B., Hohn, T., Grimsley, N. & Hohn, B. (1992). Agroinfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. *Virology* **187**, 525-533.
27. Gal-On, A., Meiri, E., Raccach, B. & Gaba, V. (1998). Recombination of engineered defective RNA species produces infective potyvirus in planta. *Journal of Virology* **72**, 5268-5270.
28. Galinat, W.C. (1988). The origin of corn. In *Corn and Corn Improvement (Third Edition)*. eds. Sprague, G.F. and Dudley, J.W. pp. 1-31. American Society of Agronomy. Inc., Crop Science Society of America Inc. and Soil Science Society of America. Inc. Madison, Wisconsin.
29. Greene, A.E. & Allison, R.F. (1994). Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* **263**, 1423-1425.
30. Greene, A.E. & Allison, R.F. (1996). Deletions in the 3' untranslated region of cowpea chlorotic mottle virus transgene reduce recovery of recombinant viruses in transgenic plants. *Virology* **225**, 231-234.
31. Grumet, R. (1995). Genetic engineering for crop virus resistance. *HortScience* **30**, 449-456.
32. Harlow, E., & Lane, D. (1988). Immunoassay. In *Antibodies: A Laboratory Manual*. pp. 553-612.
33. Henry, C.M., Barker, I., Pratt, M., Pemberton, A.W., Farmer, M.J., Cotten, J., Ebbels, D., Coates, D. & Stratford, R. (1995). Risks associated with the use of genetically modified virus tolerant plants. A report to the Ministry of Agriculture Fisheries and Food (MAFF), United Kingdom.
34. Hirst, G.K. (1962). Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus and influenza. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **27**, 303-308.
35. Hofmann, C., Vanderbruggen, H. V., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. & Van Mellaert, H. (1988a). Specificity of *B. thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7844-7848.
36. Hofmann, C., Lüthy, P., Hutter, R. & Pliska, V. (1988b). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**, 85-91.
37. Holt, C. A. & Beachy, R. N. (1992). In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNA's in transgenic plants. *Virology* **181**, 109-117.
38. Hoxter, K.A. & Lynn, S.P. (1992a). Activated Btk HD-1 protein: a dietary toxicity study with green lacewing larvae. Study Number WL-92- 155, an unpublished study conducted by Monsanto Company and Wildlife International Ltd. EPA MRID no. 43468003.
39. Hoxter, K.A. & Lynn, S.P. (1992b). Activated Btk HD-1 protein: a dietary toxicity study with parasitic Hymenopteran (*Brachymeria intermedia*). Study Number WL-92-157, an unpublished study conducted by Monsanto Company and Wildlife International Ltd. EPA MRID no. 43468004.

40. Hoxter, K.A. & Lynn, S.P. (1992c). Activated Btk HD-1 protein: a dietary toxicity study with ladybird Beetles. Study Number WL-92-156, an unpublished study conducted by Monsanto Company and Wildlife International Ltd. EPA MRID no. 43468005.
41. Jepson, P.C., Croft, B.A., & Pratt, G.E. (1994). Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Molecular Ecology* **3**, 81-89.
42. Klausner, A. (1984). Microbial insect control. *Bio/Technology* **2**, 408-419.
43. Kottier, S.A., Cavanagh, D. & Britton, P. (1995). Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **213**, 569-580.
44. Krieg, A. & Langenbruch, G.A. (1981). Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, (ed. Burges, H.D.) pp. 837-896. Academic Press, London.
45. Lai, M.M., Baric, R.S., Makino, S., Keck, J.G., Egbert, J., Leibowitz, J.L. & Stohman, S.A. (1985). Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *Journal of Virology* **56**, 449-456.
46. Lee, T-C., Bailey, M., & Sanders, P.R. (1995). Compositional comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 protein produced in ECB resistant corn and the commercial microbial product, DIPEL. Study Number 94-01-39-12. an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43533203.
47. Li, Y. & Ball, L.A. (1993). Nonhomologous RNA recombination during negative strand synthesis of flock house virus RNA. *Journal of Virology* **67**, 3854-3860.
48. Lecoq, H., Ravelonandr, M., Wipf-Scheibel, Monision, M., Raccah, B. & Dunez, J. (1993). Aphid transmission of a non-aphid transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum poxvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**, 301-307.
49. Ledinko, N. (1963). Genetic recombination with poliovirus type1: studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain. *Virology* **20**, 107-119.
50. Lomonosof, G.P. (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 323-343.
51. MacIntosh, S.C., Stone, T.B. Sims, S.R., Hunst, P., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, F.J., Fischhoff, D.A. & Fuchs, R.L. (1990). Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Insect Path.* **56**, 258-266.
52. Maggi, V.L. & Sims, S.R. (1994a). Evaluation of the dietary effects of purified B.t.k. endotoxin protein on honey bee larvae. Study Number IRC-91-ANA-13, an unpublished study conducted by Monsanto Company and California Agricultural Research, Inc. EPA MRID no. 43439202.
53. Maggi, V.L. & Sims, S.R.. (1994b). Evaluation of the dietary effects of purified B.t.k. endotoxin proteins on honey bee adults. Study Number IRC-91-ANA-12. an unpublished study conducted by Monsanto Company and California Agricultura IResearch, Inc. EPA MWD no. 43439203.
54. Matthews, R. E. F. (1991). *Plant Virology*. Academic Press, New York. 835pp.
55. Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electro blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
56. McCahon, D., King, M.Q., Roe, D.S., Slade, W.R., Newman, J.W.I. & Cleary, A.M. (1985). Isolation and biochemical characterization of intertypic recombinants of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research* **3**, 87-100.
57. Melin. B.E. & Cozzi, E.M. (1989). In *Safety of Microbial Insecticides* (eds. Laird, M., Lacey. L.A. and Davidson, E.W.) pp. 150-167. CRC Press, Boca Raton, FL.
58. Munishkin, A.V., Veronin, L.A. & Chetverin, A.B. (1988). An in vivo recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Qbeta replicase. *Nature* **333**, 473-475.
59. Nagy, P.D. & Simon, A.E. (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**, 1-9.
60. Onodera, S., Qiano, X., Gottlieb, P., Strassman, J., Frilander, M. & Mindish, L. (1993). RNA structure and heterologous recombination in the double-stranded RNA bacteriophage phi6. *Journal of Virology* **67**, 4914-4922.
61. Osburn, J. K., Sarkar, S. & Wilson, T. M. A. (1990). Complementation of coat protein-defective TMV mutants in transgenic plants expressing coat protein. *Virology* **179**, 921-925.

62. Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, G., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. & Beach, R.N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738-763.
63. Robinson, D.J. (1996). Environmental risk assessment of releases of transgenic plants containing virus-derived inserts. *Transgenic Research* **5**, 359-562.
64. Rochow, W.F. & Ross, A.F. (1955). *Plant Disease* (Reporter) **52**, 344-358.
65. Salanki, K., Carrere, I., Jacquemond, M., Balazs, E. & Tepfer, M. (1997). Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *J Virol.* **71(5)**, 3597-602.
66. Sanders, P.R., Elswick, E.N., Groth, M.E. & Ledesma, B.E. (1995). Evaluation of insect protected corn lines in 1994 US field test locations. Study Number 94-01-39-01, MSL-14179, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43665502.
67. Sanford, J.C. & Johnston, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* **113**, 395-405.
68. Sims, S.R. (1994). Stability of the CryIA(b) insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki (B.t.k. HD-1) in sucrose and honey solutions under non-refrigerated temperature conditions. Study Number IRC-91-ANA-11, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43468002.
69. Stackey, S.T. & Francki, R.I.B. (1990). Interaction of cucumoviruses in plants: persistence of mixed infections of cucumber mosaic and tomato aspermy viruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**, 409-419.
70. Tepfer, M. (1993). Viral genes and transgenic plants: what are the potential environmental risks? *Bio/Technology* **11**, 1125-1132.
71. Urban, D.J. & Cook, N.J. (1986). Standard Evaluation Procedure for Ecological Risk Assessment. EPA/540/09-86/167, Hazard Evaluation Division, Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington D.C.
72. Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G. & Shi, X.M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**, 583-590.
73. van der Kuyl, A.C., Neeleman, L. & Bol, J.F. (1991). Complementation and recombination between alfalfa mosaic virus RNA3 mutants in tobacco plants. *Virology* **183**, 731-738.
74. Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. & Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins, importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**, 239-247.
75. Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. & Van Mellaert, H. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1378-1385.
76. Vinson, S.B. (1989). Potential impact of microbial insecticides on beneficial arthropods in the terrestrial environment. In *Safety of Microbial Insecticides*. (eds. Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W.) pp. 43-64. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.
77. Weiss, B.G. & Schlesinger, S. (1991). Recombination between Sindbis virus RNAs. *Journal of Virology* **65**, 4017-4025.
78. White, K.A. & Morris, T.J. (1994). Recombination between defective tombusvirus RNAs generates functional hybrid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3642-3646.
79. Whitely, H.R. & Schnepf, H.E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 549-576.
80. Wolfersberger, M.G., Hofmann, C. & Luthy, P. (1986). Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. In *bacterial protein toxins*. eds. Falmagne, P., Fehrenbech, F.J., Jeljaszewics, J. and Thelestam, M.. Gustav Fischer, pp. 237-238. New York, New York, U.S.A.



Capítulo 13 – Manejo de resistencia de insectos

Las delta-endotoxinas producidas por *Bacillus thuringiensis* (Bt) actúan uniéndose selectivamente a los receptores específicos localizados en las microvellosidades del epitelio del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Luego de la unión, se forman poros que permiten que el contenido del lumen se filtre hacia el fluido corpóreo, causando finalmente la muerte. No existen receptores para estas toxinas en la superficie de las células intestinales de los mamíferos, por lo tanto el ganado y los humanos no son susceptibles a su acción. La actividad de las toxinas Bt ha sido explotada en la agricultura y silvicultura por más de 30 años a través del uso de formulaciones microbianas en *sprays*. Más recientemente, un número de especies vegetales (maíz, algodón, papa y tomate) han sido modificadas por ingeniería genética para que expresen la toxina Bt en el tejido foliar, para poder controlar un rango de insectos plaga incluyendo al barrenador europeo del maíz, la oruga capullera del algodón y el escarabajo de la papa del Colorado. Cuando se expresan en plantas, las toxinas Bt son mucho más persistentes y efectivas, incluso contra insectos que se alimentan en sitios difíciles o imposibles de acceder con los *sprays*. Aproximadamente 11,6 millones de hectáreas han sido sembradas con cultivos Bt en el mundo en el año 2000 (James, 2000).

A pesar del éxito comercial de los cultivos Bt, existe una preocupación generalizada acerca de la duración de sus beneficios, ya que la expresión constitutiva de las toxinas Bt en plantas llevará en algún momento a la selección y multiplicación de los escasos insectos resistentes a la toxina Bt. El potencial desarrollo de resistencia a Bt en los insectos, como consecuencia de las plantaciones comerciales de cultivos Bt, es también una preocupación para los productores agropecuarios y hortícolas que confían en el uso de formulaciones microbianas de Bt en *sprays*, para las cuales ya se han documentado casos de adaptación por parte de las plagas (Tabashnik, 1994). Si bien se suele citar como evidencia de la capacidad genética de los artrópodos de evolucionar a cepas resistentes la observación de que más de 400 especies de insectos han desarrollado resistencia hacia al menos un insecticida (Georghiou, 1986), también es igualmente importante notar que, hasta la fecha, no hay informes del surgimiento de insectos resistentes a Bt como consecuencia directa de la introducción de plantas Bt en la agricultura comercial.

Los insecticidas microbianos Bt tienen un envidiable historial de uso y es por esta razón que las autoridades regulatorias de EE.UU. y Canadá consideran que las toxinas Bt en *sprays* microbianos y en plantas transgénicas están “en el bien público” y por lo tanto son merecedoras de una protección regulatoria extra (EPA, 1999; CFIA, 1999). Dicha protección es provista a través del requerimiento de implementación obligatoria de planes de manejo de resistencia de insectos (MRI) diseñados para mitigar el desarrollo de poblaciones de insectos plaga resistentes a Bt.

Planes de manejo de resistencia de insectos

En Canadá y EE.UU. la industria agrícola ha adoptado lo que se conoce como “estrategia de alta dosis/refugio” como manera de retardar el surgimiento de resistencia a Bt. Esta estrategia implica exponer una porción de la población de la plaga a plantas Bt con una concentración extremadamente alta de la toxina [25 veces la cantidad necesaria para eliminar el 99% de los insectos susceptibles (Gould *et al.*, 1994)], mientras se mantiene otra parte de la población en un refugio donde las plagas no encuentran ninguna proteína Bt (Fig. 1). Esta estrategia tiene cuatro supuestos esenciales:

- Los genes de resistencia deben ser prácticamente recesivos. En otras palabras, los individuos con una sola copia del gen de resistencia (es decir, heterocigotas RS) tienen muy baja supervivencia en los cultivos Bt, similar a la de un individuo completamente susceptible (es decir, homocigota SS). Estadísticamente, las tasas de supervivencia RS en plantas Bt

debe ser menor al 5% de la supervivencia esperada para individuos verdaderamente resistentes (es decir, homocigotas RR) para que la estrategia tenga éxito.

- Los genes que confieren resistencia son poco frecuentes. Los estudios con *Heliothis virescens* (Gould *et al.*, 1997) y *Ostrinia nubilalis* (Andow *et al.*, 1998, 2000) avalan este supuesto, mientras que otros cuestionan su aplicación uniforme (Tabashnik *et al.*, 2000).
- El refugio de plantas no transgénicas mantendrá un número suficiente de individuos susceptibles (SS) para sobrepasar en número a los individuos resistentes (RR) durante el apareamiento de modo que la progenie sea heterocigota RS, manteniendo así una población que es casi exclusivamente RS o SS.
- La proximidad de los refugios a los cultivos Bt es suficiente para asegurar el apareamiento prácticamente aleatorio dentro de las distancias típicas de dispersión de los adultos.

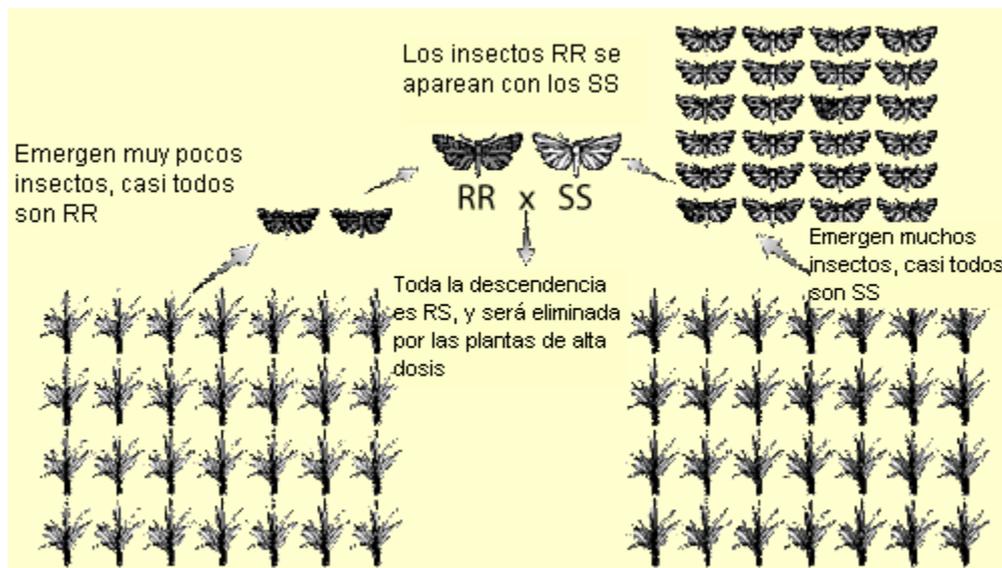


Fig.1 Cómo funciona la estrategia de alta dosis/refugio para retrasar la aparición de insectos resistentes RR en la población plaga. Reproducido de Cohen *et al.* 2000.

Alta Dosis

Un panel de consultores científicos de la EPA (EPA, 1998) concluyó que para que un cultivo Bt sea considerado de alta dosis, se debería demostrar, por al menos dos de los siguientes métodos, que contiene 25 veces la cantidad de toxina Bt necesaria para eliminar el 99% de los insectos susceptibles:

- Bioensayos de diluciones seriadas con dieta artificial que contenga tejidos liofilizados de plantas Bt (usando tejidos de plantas no-Bt como controles),
- Bioensayos con líneas de plantas con niveles de expresión de aproximadamente 25 veces menor que el cultivar comercial (determinado por ELISA cuantitativo o alguna técnica más confiable);
- Relevar grandes números de plantas comerciales en terrenos centinelas a campo (por ejemplo: método del maíz dulce centinela) para atestiguar que el cultivar esté en una DL99,9, o superior, para asegurar que el 95% de los heterocigotas sean probablemente eliminados. Con este enfoque, los híbridos de maíz dulce Bt son usados para atraer altas densidades de adultos del barrenador europeo del maíz y del gusano capullero del algodón [*Helicoverpa zea* (Boddie)], el muestreo se puede limitar a las espigas de maíz dulce en el terreno Bt (un bloque de aprox. ¼-½ acres), y se puede estimar una frecuencia de fenotipos resistentes como la proporción entre densidad de larvas/plantas en maíz Bt dulce y densidad de larvas/plantas en una plantación adyacente de maíz dulce no Bt (Andow & Hutchison, 1998).

- Similar al punto anterior, pero usando infestación controlada con una cepa de laboratorio de la plaga que tenga un valor de DL50 similar al de la cepa de campo.
- Determinar si se podría encontrar un estadio larval posterior de la plaga blanco con una DL50 que fuera alrededor de 25 veces mayor a la de la larva neonata. De ser así, podría ensayarse ese estadio sobre las plantas del cultivo para determinar si el 95% o más de las larvas del estadio posterior son eliminadas.

Es muy importante que un cultivar Bt cumpla los requerimientos de alta dosis ya que plantas con dosis moderadas^c o bajas^d podrían acelerar la selección de poblaciones de insectos resistentes a Bt (Fig. 2).

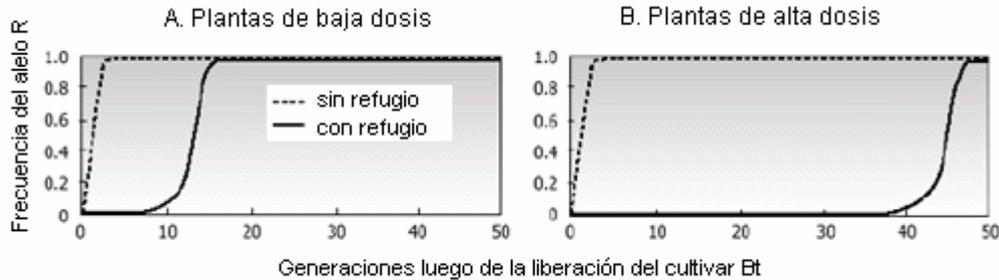


Fig. 2. Tasa de evolución de la resistencia en insectos a plantas *Bt* en diferentes condiciones, según un modelo de genética poblacional. El ajuste de los parámetros del modelo es la siguiente: plantas de baja dosis (panel A) y alta dosis (panel B) matan al 100% de los insectos SS y al 0% de los insectos RR. De las plantas de baja dosis, el 5% de los insectos RS sobrevivieron y llegaron a la madurez, mientras que en las plantas de alta dosis, sólo el 0.5% de los insectos RS sobrevivieron. La frecuencia inicial del alelo R es 10^{-3} . La eficacia del modelo indica que si un cultivar es crecido en el 90% de la superficie del campo y el resto sirve como refugio no-*Bt*, la resistencia a la toxina *Bt* evoluciona en unas 15 generaciones de insectos. En las mismas condiciones, el cultivar de alta dosis permanece efectivo por unas 45 generaciones de insectos. Si no se usa el refugio, la resistencia evoluciona en menos de 5 generaciones en ambos cultivares. Reproducido de Cohen *et al.* 2000.

Uso efectivo de los refugios

Los refugios están compuestos por plantas no Bt del cultivo que se usan para mantener insectos susceptibles a Bt en la población. El gran número de homocigotas SS que sobreviva en el refugio estará disponible para aparearse con cualquier insecto RR poco frecuente que sobreviva sobre las plantas Bt. La progenie de la cruce SS x RR será heterocigota RS y por lo tanto será susceptible a la toxina Bt presente en las plantas.

Gran parte del debate actual en torno al MRI se focaliza en el tamaño necesario del refugio y el grado en el cual se pueden implementar medidas de control de insectos dentro del refugio con el fin de minimizar las consecuencias económicas de la depredación de insectos. Estos factores son variables y dependen del cultivo, la producción y prácticas de rotación regionales, y las fenologías de los insectos plaga primarios³ y secundarios⁴. Por ejemplo, en EE.UU. el algodón Bt ha sido utilizado eficientemente tanto con un 20% de refugio de algodón no Bt que puede ser rociado con un insecticida foliar no Bt, como con un refugio del 4% sin control de insectos. Algunos han recomendado que si se les permite a los productores rociar con insecticidas, entonces los refugios deberían ser tan grandes como el 50% con el fin de mantener una población suficiente de insectos susceptibles.

^c Un cultivar de dosis moderada es el que expresa una concentración de toxina que se encuentra por debajo de la dosis alta para un insecto dado, pero inicialmente permite un control económicamente aceptable como herramienta única para el control de la plaga (EPA 1998).

^d Un cultivar de baja dosis es el que produce una concentración de toxina tal que reduce la capacidad de la plaga pero no resulta, por sí sólo, una herramienta económicamente aceptable para el control de la plaga. (EPA 1998).

Si bien se han propuesto varias estrategias de uso eficiente para retrasar el surgimiento de resistencia, y la mayoría de ellas han sido examinadas por medio de modelos informáticos, existen pocos datos empíricos que demuestren la eficacia de la estrategia alta dosis/refugio.

Un estudio reciente realizado por Shelton *et al.* (2000) ha intentado responder un número de preguntas relacionadas a la ubicación del refugio, su tamaño, y el impacto del control de insectos dentro del mismo. Las pruebas involucraron ensayos a campo de pequeña escala a lo largo de dos años usando plantas de brócoli transgénicas que expresan la toxina Bt Cry1A, y poblaciones de la polilla de las crucíferas (“diamondback moth”, *Plutella xylostella*) con resistencia a esta toxina. La polilla de las crucíferas es el único insecto que ha desarrollado resistencia a las formulaciones en *spray* de *Bacillus thuringiensis* a campo, y por cruzamiento con individuos resistentes con una cepa susceptible de laboratorio, los autores pudieron generar poblaciones con la frecuencia deseada de resistencia.

A pesar de las circunstancias únicas de cada combinación de especie de cultivo e insecto plaga y los riesgos inherentes a las generalizaciones basadas en extrapolaciones deducidas de sistemas de modelos únicos, los hallazgos de Shelton *et al.* (2000), como se resumen a continuación, tienen importantes consecuencias para los esquemas de manejo de resistencia de plagas:

- Basándose en el número de larvas sobre plantas refugio, un refugio separado de 20% fue más efectivo para conservar larvas susceptibles que un refugio intercalado del 20%. Los refugios intercalados tenían las plantas no Bt asignadas aleatoriamente dentro del terreno.
- El rociado de plantas en el refugio del 20% con una formulación de Bt relacionada (Cry1C, para la cual no hay resistencia cruzada documentada con Cry1A) dio como resultado niveles progresivamente superiores de resistencia (aproximadamente 10%) en el transcurso de la estación de cultivo en comparación con la situación de refugio sin rociar con insecticida de ese tipo.

En las autorizaciones de cultivares de maíz y papa Bt en EE.UU. y Canadá, se han incluido condiciones similares, en lo que respecta al tamaño del refugio de un 20% y al requisito de mantener la funcionalidad del refugio como una reserva de insectos susceptibles viables. La diferencia relevante entre el manejo del refugio para maíz Bt y papa Bt es que la aplicación de los *sprays* insecticidas ha sido siempre necesaria para controlar las infestaciones producidas por el escarabajo de la papa del Colorado, mientras que, en términos generales, no se han utilizado métodos de control similares para el manejo del barrenador europeo del maíz.

Principios para el mejor manejo de cultivos Bt

Los siguientes son principios para la mejor conducción de planes de MRI de cultivos Bt (EPA, 1999) y se encuentran reflejados en las iniciativas conjuntas de los sectores del gobierno y la industria de EE.UU. y Canadá para el maíz Bt:

- Es necesario un plan específico de MRI para asegurar el manejo de la resistencia a largo plazo. Elementos incluidos en el plan de MRI son: alta dosis, refugio estructurado, información ecológica y biológica de la plaga susceptible, impacto sobre especies secundarias, impacto sobre plagas que afectan múltiples cultivos Bt, potencial de resistencia cruzada, mecanismos de resistencia, monitoreo/vigilancia, y acción de remediación.
- Para asegurar un manejo de resistencia a largo plazo es necesaria una estrategia de alta dosis/refugio estructurado.
- La educación, adopción y cumplimiento del productor agropecuario son esenciales para la implementación y el éxito a largo plazo de la estrategia de manejo de resistencia.
- Para potenciar los objetivos del manejo de plagas, los cultivos Bt se usarán como parte de un programa de manejo integrado de plagas.
- El monitoreo y la vigilancia de la actuación anual coordinada son necesarios para detectar o hacer un seguimiento del desarrollo de resistencia.

- Es necesaria la acción de remediación coordinada e inmediata para los incidentes de resistencia confirmados o sospechados.
- Las estrategias de MRI deberán ser adaptadas para abordar las inquietudes del manejo de resistencia propias de cada región.
- Para los objetivos del manejo sustentable de plagas, es esencial el uso eficiente de las tácticas de un plan de MRI con sus diferentes modos de acción, incluyendo pesticidas convencionales, toxinas Bt expresadas en cultivos con distintos modos de acción, métodos de control biológico, y otros métodos de control.
- Se deberá realizar una investigación continua en el manejo de resistencia para evaluar su efectividad, y modificar, de ser necesario, las estrategias de MRI para los cultivos Bt.

Manejo de resistencia de insectos de maíz Bt en Estados Unidos

Los siguientes son los elementos del plan de MRI del sector industrial desarrollados para el maíz Bt cultivado en EE.UU. (NCGA 1999). Para la mayor parte del área de maíz (> 90%) donde es muy poco probable el uso de insecticidas, el plan es consistente y avalado por las recomendaciones de otros grupos, incluyendo el Comité Regional de Investigación sobre la Ecología y el Manejo del Barrenador Europeo del Maíz del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (*USDA Regional Research Committee on the Ecology and Management of European Corn Borer*) (NC-205 1997, 1998), el Subpanel del Panel Científico Asesor de la EPA (*EPA Scientific Advisory Panel Subpanel*, 1998), y el panel de expertos del Instituto para las Ciencias de la Vida (*International Life Sciences Institute*) y del Instituto de Ciencias Ambientales (ILSI 1999). En las áreas donde los productores son más proclives a utilizar insecticidas en el refugio (< 10% de la superficie de maíz), el plan de MRI fue influenciado por la necesidad de asegurar la practicidad para el productor y la adopción por el productor de los requisitos del plan:

- Se impondrán mínimos requisitos de refugio en todas las regiones maiceras de los Estados Unidos. Se les solicitará a los productores agropecuarios que planten un mínimo de 20% de maíz no Bt en los estados que conforman la región núcleo (“cinturón”) maicera y la porción norte de la región maicera/algodonera⁵. En la porción sur de la región maicera/algodonera⁶ se solicitará un refugio mínimo de 50% de maíz no Bt.
- Aunque esencialmente la región maicera/algodonera completa se sometió al requisito de 50% refugio en la campaña de 1999, los modelos de simulación predicen que un refugio del 20% en la región maicera/algodonera norte es más que suficiente para proveer eficacia a largo plazo contra los barrenadores del maíz (estos modelos asumen tres generaciones de barrenadores/año). Los modelos de simulación también predicen que un refugio del 20% mantiene la susceptibilidad de las poblaciones del gusano cogollero del maíz (*Helicoverpa zea*) en la región maicera/algodonera norte debido a una menor supervivencia de invernantes, menos generaciones/año, menor adopción de algodón Bt, y una mayor proporción de maíz a algodón en comparación con la porción sur de la región maicera/algodonera.
- Las plantaciones a campo de híbridos de maíz que producen la proteína Cry1Ac, derivados del Evento DBT418, seguirán siendo restringidas a las regiones algodoneras de Estados Unidos, según se define en los términos y condiciones actuales de la Reg. No. 69575-2 de la EPA.
- Hay regiones limitadas del cinturón maicero donde históricamente se han usado insecticidas convencionales para controlar el barrenador europeo y el barrenador de maíz del sudoeste (*Diatraea grandiosella* Dyar) (las infestaciones del gusano cogollero del maíz no han justificado históricamente el tratamiento del maíz a campo). Los productores tendrán la opción de aplicar tratamientos de insecticidas convencionales en los refugios de maíz no Bt, no obstante, se los instruirá específicamente para que lo hagan sólo si el nivel de presión de la plaga alcanza o excede los umbrales económicos. Además, a los productores de estas áreas limitadas que deseen reservarse la opción de tratar sus refugios con insecticidas convencionales se les solicitará que planten el refugio dentro de un cuarto de

milla de sus plantaciones de maíz Bt. A los productores se los instruirá específicamente para que no usen pesticidas microbianos basados en Bt en el refugio.

- Excepto por lo expuesto en el punto anterior, se fomentará que los productores planten sus extensiones de maíz no Bt dentro del rango de distancia de un cuarto de milla de la extensión cultivada con maíz Bt, donde ello resulte factible, y se les exigirá que planten el refugio dentro de una distancia de media milla con respecto a su plantación de maíz Bt. Los productores necesitan este grado de flexibilidad en la ubicación del refugio de modo que puedan maximizar su eficiencia durante el corto período de tiempo que se planta el maíz en la mayoría de las regiones del cinturón maicero.
- Los productores que compren híbridos de maíz Bt firmarán un acuerdo (*Stewardship Agreement*) por el cual se comprometerán a cumplir los requisitos de MRI. A cada comprador de maíz Bt se le entregará una copia de la “Guía de Productores de Maíz Bt” que contiene un conjunto uniforme de recomendaciones y requisitos del MRI.
- La clave del éxito de un plan de esta naturaleza es un fuerte programa de educación al productor. Los productores deben entender claramente la importancia del MRI para preservar la eficacia a largo plazo de esta tecnología, y que su participación en este programa de administración es vital para su éxito. Cada una de las compañías semilleras participantes de este plan se compromete a continuar con sus exhaustivos programas continuos de educación. El plan de la industria será comunicado por medio de las compañías semilleras, además de ser reforzado a través de esfuerzos de comunicación y educación de la Asociación Nacional de Productores de Maíz (*National Corn Growers Association*), la Asociación Americana de Protectores de Cultivos (*American Crop Protection Association*), las asociaciones maiceras estatales y locales, los servicios de extensión rural de las universidades, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA), y otros. Los esfuerzos mancomunados de estos diferentes grupos comunicando un Plan de MRI uniforme enviarán un fuerte mensaje a la comunidad de productores agropecuarios sobre la importancia de su implementación.
- Las inscripciones actuales de maíz Bt requieren el monitoreo de poblaciones de insectos (por ej.: el barrenador del maíz, el gusano cogollero) para medir los cambios en la susceptibilidad hacia la proteína insecticida (por ej.: Cry1Ab, Cry1Ac) expresada en los híbridos de maíz. Muchas compañías semilleras han estado trabajando en forma cooperativa en este esfuerzo. Bajo este plan de MRI propuesto, las poblaciones del barrenador europeo y del gusano cogollero seguirán siendo monitoreadas en forma similar anualmente. Hasta tanto no se disponga de métodos validados para el monitoreo del barrenador del sudoeste, el monitoreo de las poblaciones de este insecto se iniciará según lo que se considere más apropiado.
- Anualmente se realizarán relevamientos para evaluar el grado de adopción del plan de MRI por parte de los productores. Si el grado de adopción dentro de una región se encuentra por debajo de las expectativas, las industrias participantes en este plan, conjuntamente con otras partes involucradas (gubernamentales o individuales), intensificarán los esfuerzos en educación del productor en dichas áreas. A los productores que ignoren repetidamente los requisitos del plan se les restringirá el futuro acceso a esta tecnología.
- Se instruirá a los clientes (productores y distribuidores de semillas) para que se contacten con el agente registrado o el distribuidor autorizado si ocurren incidentes de niveles inesperados de daño por el insecto blanco durante el uso de producto Bt del agente registrado. Los agentes registrados (o sus distribuidores autorizados) investigarán e identificarán la causa de dicho daño por medio de un muestreo local a campo de los tejidos vegetales o plantas de los híbridos de maíz que expresan la proteína insecticida Bt y por el muestreo de las poblaciones de plagas locales, seguido por ensayos apropiados *in vitro* y en planta. Luego de confirmar por inmunoensayos que las plantas contienen la proteína Cry1A apropiada, se realizarán bioensayos para determinar si la población de insectos colectada muestra un fenotipo resistente.

En caso de que se disponga y se encuentre validado para la especie plaga blanco, se empleará un ensayo de concentración discriminante para definir un caso de resistencia confirmado. Para otras plagas blanco, en tanto no se establezca y valide un ensayo de concentración discriminante, los agentes registrados utilizarán lo siguiente para definir un caso confirmado de resistencia de insecto:

La progenie de la población muestreada será considerada resistente si muestra AMBAS de las siguientes características en bioensayos iniciados con neonatos:

Una DL50 en un bioensayo dietario estándar (incorporando la proteína Cry1A apropiada) que exceda el límite superior del intervalo de confianza del 95% de la DL50 media histórica para poblaciones susceptibles, acorde a lo establecido por el programa base de monitoreo continuo,

Supervivencia > 30% y > 25% del área foliar dañada en un bioensayo de cinco días usando el tejido foliar Cry1A positivo apropiado en condiciones controladas de laboratorio.

Basándose en la investigación y experiencia continua, esta definición práctica de resistencia confirmada puede justificar ajustes adicionales. En el caso de que los agentes registrados encuentren apropiado modificar el criterio especificado en la definición práctica, obtendrán la aprobación de la Agencia para establecer una definición más adecuada.

- Los agentes registrados informarán a la Agencia todos los casos confirmados de resistencia de plagas, acorde a lo descrito anteriormente, y dentro del plazo de 30 días. En cuanto se identifique un caso confirmado de resistencia, los agentes registrados tomarán las siguientes medidas de mitigación inmediatas:

Notificar a los clientes y a los agentes extensionistas en el área afectada,

Recomendar a los clientes y a los agentes extensionistas del área afectada que usen medidas de control alternativas para reducir o controlar la población de plaga local, y donde sea apropiado, recomendar a los clientes y a los agentes extensionistas en el área afectada que el rastrojo de los cultivos sea incorporado al suelo prontamente luego de la cosecha para minimizar la posibilidad de insectos invernantes.

Dentro de los 90 días del caso confirmado de resistencia de plagas, como se lo describió anteriormente, los agentes registrados procederán a:

Notificar a la Agencia acerca de las medidas mitigativas inmediatas implementadas,

Presentar a la Agencia un plan de acción de manejo de resistencia a largo plazo para el área afectada,

Trabajar estrechamente con la Agencia para asegurar que se implemente un plan de acción de manejo de resistencia a largo plazo para el área afectada, e

Implementar un plan de acción que sea aprobado por la EPA y que consista de algunos o todos de los siguientes elementos, según la justificación:

Notificar a los clientes y a los extensionistas en el área afectada sobre la resistencia de la plaga,

Incrementar el monitoreo en el área afectada, y asegurarse de que anualmente se obtengan muestras de las poblaciones de las plagas blanco locales,

Recomendar medidas alternativas para reducir o controlar las poblaciones de plagas blanco en el área afectada,

Implementar medidas de MRI locales intensificadas en el área afectada basándose en los últimos resultados de investigaciones. La implementación de dichas medidas será coordinada por la Agencia con otros agentes registrados; y

Si todos los elementos arriba mencionados no resultaran efectivos para mitigar la resistencia, los agentes registrados cesarán voluntariamente la venta de todos los híbridos de maíz Bt sujetos al Plan de MRI en el departamento donde se haya experimentado la pérdida de eficacia y en los departamentos linderos hasta que se implemente un plan de manejo local efectivo aprobado por la EPA. Durante el período de suspensión voluntaria, los agentes registrados podrán vender y

distribuir en esos departamentos únicamente después de haber obtenido aprobación de la EPA para estudiar la resistencia en dichas regiones. La implementación de tal estrategia será coordinada por la Agencia conjuntamente con los otros agentes registrados y partes involucradas.

Si la EPA acepta que se ha implementado un plan local efectivo de manejo de resistencia, el cual logra mitigar la resistencia, entonces los agentes registrados podrán reasumir las ventas en la/s región/es afectada/s.

- Los agentes registrados participantes del Plan de MRI de la Industria para el maíz Bt se reunirán con la Agencia anualmente para discutir los resultados de los relevamientos de adopción por parte de los productores, de los programas de monitoreo de insectos, y de otros temas pertinentes del plan.

Conclusión

Es imprescindible que los planes de MRI se basen en la mejor ciencia disponible (ello puede incluir modelos de simulación), refleje la producción y prácticas de rotación regionales, y tenga en cuenta las fenologías de los insectos plaga primarios y secundarios tal como ocurren en cada zona. Resulta de igual importancia que los planes de MRI sean claros, flexibles, prácticos y económicamente factibles; y si no lo son, los planes de MRI simplemente serán ignorados por los productores y se perderán los beneficios directos e indirectos de la tecnología.

Referencias

1. Canadian Food Inspection Agency (CFIA). (1999). Insect Resistance Management of *bt* Corn in Canada. Ottawa, Canada.
2. Cohen, M.B., Gould, F. & Bentur, J.S. (2000). *Bt* rice: practical steps to sustainable use. *International Rice Research Notes* **25**(2), 4-10.
3. Environmental Protection Agency (EPA) (1998). FIFRA Scientific Advisory Panel, Subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant-Pesticides and Resistance Management, Feb. 9 - 10, 1998 (OPP Docket No. 00231).
4. Environmental Protection Agency (EPA) (1999). EPA and USDA Position Paper on Insect Resistance Management in *bt* Crops. Washington D.C.
5. Georgiou, G.P. (1986). The magnitude of the resistance problem. Pp. 14-39 in *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press.
6. Gould, F., Follett, P., Nault, B. and Kennedy, G. (1994). Resistance management strategies for transgenic potato plants. In *Advances in Potato Pest Biology and Management*. Zehnder, G.W., Powelson, M.L., and Raman, R.K. (eds.). APS Press, St. Paul, MN. pp 255-277.
7. Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Summerford, D., Heckel, D.G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R. & Laster, M. (1997). Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3519-3523.
8. International Life Sciences Institute (ILSI) Health and Environmental Sciences Institute (1999). An evaluation of insect resistance management in *bt* field corn: A science-based framework for risk assessment and risk management. Report of an expert panel. ILSI Press, Wash. DC.
9. James, C. (2000). Global review of commercialized transgenic crops: 2000 (Preview). International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications.
10. National Corn Growers Association (NCGA) (1999). Insect Resistance Management Plan: Planting Refuges, Preserving Technology.
11. Shelton, A.M., Tang, J.D., Roush, R.T., Metz, T.D. & Earle, E.D. (2000). Field tests on managing resistance to *Bt*-engineered plants. *Nature Biotechnology* **18**, 339-342.
12. Tabashnik, B.E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **39**, 47-79.



Apéndice 1 – La biología del maíz

Introducción

El maíz (*Zea mays* L. ssp *mays*) se cultiva en todo el mundo, a latitudes que van desde la línea del Ecuador hasta un poco más allá de los 50 grados norte y sur, desde el nivel del mar hasta una altura mayor a 3.000 metros, en climas frescos y cálidos, y con ciclos de crecimiento que duran entre 3 a 13 meses (CIMMYT 2000). Es el tercer cultivo más importante en el mundo luego del arroz y el trigo, con una producción anual de 600 millones de toneladas (FAO 2000a). Los países en desarrollo suman el 64% del área maicera mundial y el 43% de la producción mundial de maíz (CIMMYT 2000). Estados Unidos es el mayor productor de maíz con una producción de 240 millones de toneladas en 1999 (FAO 2000a). La FAO estimó que se cultivaron 8.000.000 ha de maíz en el sudeste Asiático en 1999, siendo Indonesia el mayor productor de la región con 9,1 millones de toneladas (Tabla 1).

Tabla 1. Datos estadísticos de la producción, rendimiento y área cosechada de maíz en países asiáticos en 1999 (FAO, 2000¹).

País	Área (ha)	Producción (t)	Rendimiento (hg/ha)
Camboya	50.000	50.000	10.000
Indonesia	3.452.398	9.134.404	26.458
Laos	40.730	96.110	23.597
Malasia	28.000	50.000	17.857
Myanmar	183.357	302.620	16.504
Filipinas	2.701.000	4.643.000	17.190
Tailandia	1.300.000	4.629.634	35.613
Vietnam	686.900	1.751.900	25.504

1. FAO 2000. FAOSTAT Database Records

<http://apps.fao.org/page/from?collection0ProductionCropsPrimary&domain=Production-&servlet=1&language=EN&hostname=apps.fao.org&version=default>

Se estima que para el año 2020 la demanda mundial de maíz será mayor que la de trigo y arroz. El rendimiento y el área de producción de maíz necesitarán incrementarse para abastecer las necesidades de una población mundial en aumento. Las proyecciones indican que Asia representará el 60% del incremento en la demanda de maíz (Calvo *et al.*, 1999), la cual tendrá que ser abastecida por medio de una combinación de mayores rendimientos regionales e importaciones suplementarias de otras naciones productoras de maíz. Lo primero requerirá la adopción de variedades superiores, estrategias de manejo mejoradas, y donde sea apropiado, nuevas tecnologías con el fin de optimizar la producción de maíz.

Consumo y usos

El maíz representa un alimento de primera necesidad para una proporción significativa de la población mundial y suplementa la dieta de otras millones de personas (Tabla 2). En términos generales, el 21% de la producción mundial total de maíz se consume como alimento, con un consumo y utilización muy variables alrededor del mundo (Morris, 1998). En México y África sub-sahariana, donde el maíz ha sido tradicionalmente el principal alimento de la dieta (68% México y 85% África sub-sahariana) el maíz cultivado se usa directamente como alimento humano (Morris, 1998). A medida que el cultivo y el consumo de maíz se expandieron a otras partes del mundo, las dietas tradicionales se fueron modificando para incorporar al maíz, pero sólo como un complemento de la dieta ya existente. En el sudeste asiático, el arroz sigue siendo el principal alimento con la excepción de la región este de Indonesia donde el maíz es una parte primordial de la dieta (Morris, 1998). En general, el maíz cultivado en el sudeste asiático representa una pequeña proporción de la dieta y es principalmente producido con fines de alimentación animal.

Tabla 2. Mayores consumos per cápita en el mundo (Morris 1998¹).

País	Kg.
Malawi	137
México	127
Zambia	113
Guatemala	103
Honduras	98
Sudáfrica	94
El Salvador	93
Kenia	93
Zimbabwe	89
Lesotho	87
Venezuela	68
Nicaragua	56

1. Morris, ML, 1998. Overview of the world mize economy. En: Maize Seed Industries in Developing Countries. ML Morris (ed). Lynne Rienner Publishers, Inc. pp. 13-34.

Tipos de maíz

Zea mays ssp *mays* ha sido clasificado en varios grupos acorde a la estructura y composición del endosperma (Tabla 3; Mink & Dorosh, 1985). El diverso rango de tipos de endospermas le otorga al maíz la posibilidad de ser utilizado en muchos estilos diferentes de cocina y para muchos propósitos diversos.

Tabla 3. Clasificación de *Z. mays* ssp. *mays* de acuerdo con la estructura y composición del endosperma (Mink & Dorosh 1985¹).

Grupo	Nombre común	Descripción
<i>Z. mays indentata</i> Sturt	maíz dentado	Granos que se presentan dentados al momento de madurez cuando pierde humedad. Constituye ~75% de la producción mundial, la mayor parte en los países desarrollados.
<i>Z. mays indurata</i> Sturt	maíz liso o flint	Endosperma extremadamente duro que no se presenta dentado en la madurez, grano identificable por su gran tamaño y forma redondeada. Constituye ~ el 15% de la producción mundial, y es usado principalmente para la producción de harina.
<i>Z. mays amylaces</i> Sturt	maíz harinoso	Caracterizado por granos grandes y blandos, aptos para el procesamiento. Común en países en desarrollo. Constituye ~10-12% de la producción mundial.
<i>Z. mays ceritina</i> Kulesh	maíz ceroso	El endosperma contiene sólo amilopectina, lo que le da una textura cerosa. Su uso es limitado, se usa para determinados productos y en reemplazo de la tapioca.
<i>Z. mays everata</i> Sturt	maíz pisingallo o popcorn	Cuando se calienta el grano el endosperma se expande y "explota". Se cultiva para palomitas o pochoclo, principalmente para los países desarrollados, pero constituye menos del 1% de la producción mundial.
<i>Z. mays saccharata</i> Sturt	maíz dulce	El endosperma contiene azúcares simples, ya que le falta la enzima para transformarlos en almidón. Su principal uso es el consumo directo del grano es su estado lechoso. Constituye menos del 1% de la producción mundial.
<i>Z. mays tunicata</i> Sturt	maíz tunicado o pod	Con granos envainados. Se lo considera un ancestro importante del maíz domesticado, aunque no tiene actualmente ninguna aplicación agronómica

1. Mink, SD & Dorosh, PA 1985. An overview of corn production En: The corn economy of Indonesia. Cornell University Press, Londres.

Biología de *Zea mays*

Descripción general

El maíz es una gramínea anual alta, monoica, con una altura que varía entre 1 y 4 metros (Watson & Dallwitz, 1992). El tallo principal está formado por nudos e internudos claramente definidos. Los internudos son anchos en la base y se van estrechando hacia la inflorescencia terminal en el extremo superior de la planta. Las láminas de las hojas se encuentran en un patrón alternado a lo largo del tallo. El maíz es una gramínea única ya que ambas flores masculinas y femeninas se encuentran en la misma planta pero localizadas en forma separada. La panoja o inflorescencia estaminada (masculina) forma una larga panícula terminal expandida que se asemeja a racimos tipo espigas. El polen se dispersa a partir de la panoja y es viable durante aproximadamente 10-30 minutos, ya que es rápidamente disecado en el aire (Kiesselbach 1980). Las plantas de maíz dispersan el polen durante un período de hasta 14 días.

La fase reproductiva comienza cuando una o dos yemas laterales, presentes en las axilas de las hojas, se desarrollan y forman la inflorescencia pistilada o flor femenina (Purseglove 1972). La yema lateral comienza la transformación para formar un eje central (marlo) sobre el cual se ubicarán las flores. En cada flor comienza a alargarse el estilo hacia el extremo del eje preparándose para la fertilización. Estos estilos forman largas hebras, conocidas como "barbas" o "sedas". La base de la seda es peculiar, ya que se alarga continuamente hasta que ocurre la fertilización (Purseglove 1972). Los estilos pueden alcanzar una longitud de 30 cm, los más largos conocidos en el reino vegetal. Los granos de maíz individuales, o frutos, son únicos en el sentido que la semilla madura no está cubierta por brácteas florales (glumas, lemas y páleas), como ocurre en la mayoría de las otras gramíneas, sino que la estructura entera está encerrada y protegida por grandes brácteas foliares modificadas (chalas). El conjunto así formado se conoce como espiga o mazorca (Hitchcock & Chase, 1951). Las flores femeninas maduras seguirán competentes para la fertilización hasta dos semanas, y al final del lapso si no ocurrió la fertilización, los núcleos se desorganizarán y ya no será posible la fertilización (Hitchcock & Chase, 1951).

El polen del maíz, una planta protandria, madura antes que la flor femenina esté receptiva (Purseglove 1972). Esto pudo haber sido un mecanismo antiguo para asegurarse la polinización cruzada, pero ya no se considera propicio para las prácticas agrícolas modernas. Sin embargo, décadas de selección convencional y mejoramiento han producido muchas variedades de maíz con madurez similar para ambas flores masculinas y femeninas, de modo de asegurar la producción de semillas para fines agrícolas.

Reproducción

En condiciones naturales, el maíz se reproduce sólo por producción de semilla. La polinización ocurre con la transferencia de polen desde la panoja hacia las sedas de la espiga. Alrededor del 95% de los óvulos reciben polinización cruzada y el 5% se autofecundan (Poehlman, 1959), aunque las plantas son completamente autocompatibles. El maíz, como una planta totalmente domesticada, ha perdido toda capacidad de diseminar sus semillas y depende enteramente de la asistencia del hombre para la distribución (Stoskopf 1985). Los granos se encuentran firmemente unidos al marlo y si las espigas caen al suelo, emergen tantas plántulas competidoras que la probabilidad de que algún grano de maíz madure es extremadamente baja.

El maíz no se puede reproducir asexualmente por medios naturales. Es posible reproducir el maíz usando técnicas de cultivo de tejidos, sin embargo, este proceso ha demostrado ser extremadamente difícil con baja tasa de éxito (Hoisington *et al.*, 1998).

Clasificación y filogenia del maíz

Zea es un género que pertenece a la familia de las gramíneas, Poaceae, en la tribu Andropogoneae, pero en la literatura se la cita comúnmente como perteneciente a la tribu

Maydeae^o. *Zea* (*zeia*) es derivado del nombre antiguo que le daban los griegos a una gramínea alimenticia. El género *Zea* consiste en cuatro especies de las cuales sólo *Zea mays* ssp. *Mays* L es económicamente importante. Las otras especies *Zea*, denominadas teosintes, son mayormente gramíneas silvestres nativas de México y América Central (Doebley, 1990). El número de cromosomas en *Zea mays* es $2n=20, 21, 22, 24$ (FAO, 2000c).

La tribu Maydeae comprende siete géneros: dos de origen americano, *Zea* y *Tripsacum*, y cinco de origen oriental que se extienden desde India por el sudeste asiático hasta Australia, e incluyen *Coix*, *Sclerachne*, *Polytoca*, *Chionachne* y *Trilobachne* (Watson & Dallwitz 1992). Se considera que la filogenia del maíz fue principalmente determinada por los géneros americanos *Zea* y *Tripsacum*, sin embargo se acepta que el género *Coix* contribuyó al desarrollo filogenético de la especie *Zea Mays* (Radu *et al.*, 1997). El género *Manisuris* de la tribu Andropogoneae también pudo haber contribuido a la evolución de *Zea mays* (Eubanks 1997a, Radu *et al.*, 1997).

Centro de origen y progenitores del maíz

Se ha establecido el centro de origen de *Zea mays* ssp. *Mays* como la región Mesoamericana, actualmente México y América Central (Watson & Dallwitz, 1992). El período exacto de domesticación y los antecesores de los cuales se originó el maíz no están claros. Los registros arqueológicos sugieren que la domesticación del maíz comenzó al menos hace 6.000 años, ocurriendo independientemente en regiones del sudoeste de EE.UU., México y América Central (Mangelsdorf, 1974). Los orígenes del maíz domesticado han sido difíciles de trazar ya que se cree que los eventos de hibridación en su evolución han involucrado a un maíz silvestre antecesor actualmente extinto del cual se ha encontrado poca evidencia (Eubanks 1997a).

Frecuentemente se describen a las especies Teosintes (*Z. diploperennis* y *Z. mays* ssp. *mexicana*) y *Tripsacum* como participantes del proceso de domesticación del maíz (Mangelsdorf, 1974; Galinat, 1988). Una primera hipótesis proponía que *Z. mays* ssp. *mexicana* era el producto de una hibridación natural entre *Tripsacum* y *Zea* (Mangelsdorf, 1974). Posteriores cruzamientos entre el teosinte y el maíz silvestre podrían haber producido las razas de maíz moderno. También se ha propuesto la posibilidad de la hibridación intergenérica tanto de *Z. diploperennis* o *Tripsacum* con un maíz silvestre extinto como el origen ancestral del *Z. mays* (Radu *et al.*, 1997; Purseglove, 1972). Eubanks (1993, 1997a) sugiere que el maíz domesticado pudo haberse originado por medio de la selección humana sobre los híbridos naturales entre *Tripsacum* y teosintes perennes.

Diversidad del germoplasma

Un estudio de 1992 concluyó que las razas locales de maíz ocupaban el 42% de la tierra en producción de los países menos desarrollados (México, 1994). México y América Central son las únicas regiones donde se encuentran las líneas ancestrales de maíz, como el maíz tunicado o pod (*Zea mays* L. var. *tunicata*, Mink & Dorosh, 1985). La supervivencia de las razas locales de maíz se ha atribuido al rol integral del maíz en las comunidades pequeñas donde tiene usos muy específicos como alimento y otras funciones especiales. Estas razas locales han sido bien caracterizadas en América Latina y se sabe que en esa región hay germoplasma que aún no ha sido evaluado.



Fig. 1. Para aumentar la diversidad genética del maíz en Estados Unidos, el Proyecto de Mejoramiento del Germoplasma de Maíz (GEM) busca combinar germoplasmas exóticos, como estos maíces de colores y formas raras de América Latina, con líneas de maíz domésticas. Foto cortesía del Servicio de Fotografía del Servicio de Investigación Agrícola del USDA.

^o Se empleará en este documento la clasificación del maíz en la tribu Maydeae debido a su uso común en la literatura. Referirse a Soreng *et al.* (2000) para ver la situación taxonómica previa y actual de la mayoría de las especies de gramíneas.

En los países en desarrollo hay una tendencia cada vez mayor a adoptar variedades mejoradas de maíz, principalmente para cumplir con las demandas del mercado. En México, sólo el 20% de las variedades de maíz cultivadas hace 50 años se siembran actualmente (World Watch Institute 2000). La reducción en la diversidad genética en las variedades modernas de maíz enfatiza la importancia de conservar las características genéticas para futuros mejoramientos. Liderando la preservación del germoplasma de maíz, se encuentra el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), que tiene la mayor colección mundial de accesiones de maíz, con más de 17.000 líneas (CIMMYT 2000). Los expertos en conservación han recomendado la colección de especies emparentadas distantes de maíz nativas de Asia para asegurar su preservación para futuras investigaciones (Sharma, 1998).

Especies emparentadas del maíz

Teosintes: Las especies emparentadas más cercanas del maíz son los teosintes, los cuales en su totalidad pertenecen al género *Zea*. Los teosintes son gramíneas silvestres nativas de México y América Central y tienen una distribución limitada (Mangelsdorf et al., 1981). Las especies de teosinte muestran poca tendencia a la dispersión más allá de su rango natural y la distribución se encuentra restringida a América del Norte, Central y del Sur. No se ha informado su existencia en el sudeste de Asia (Watson & Dallwitz 1992).

El teosinte emparentado más cercanamente a *Z. mays* ssp. *mays* es *Z. mays* ssp. *mexicana* (Schrader) Iltis (previamente clasificado como *Euchlaena mexicana*, *Zea mexicana*, $2n = 20$). Este teosinte anual del centro de México es una gramínea de flores grandes, mayormente de características tipo maleza con una amplia distribución a lo largo de las colinas centrales de México. No se dispersa fácilmente. Tiene uso limitado como forraje fresco y puede ser problemático debido a su tendencia a comportarse como maleza (Doebley, 1990; Watson & Dallwitz, 1992).

Z. diploperennis Iltis et al. y *Z. perennis* (Hitchc.) Reeves y Mangelsd son teosintes perennes diploides ($2n=20$) y tetraploides ($2n=40$), respectivamente, con distribuciones limitadas en Jalisco, México. *Z. diploperennis* estaba casi extinguido cuando se lo encontró en los últimos años de la década de 1970, y desde entonces ha sido muy utilizado para investigar el origen ancestral del maíz (Eubanks, 1995). Se ha informado que *Z. perennis* está establecido en el sur de California, Estados Unidos (Doebley, 1990; Hitchcock & Chase, 1951).

Zea luxurians (Durieu et Asch.) Bird. es un teosinte anual del sudeste de Guatemala (Doebley, 1990; Watson & Dallwitz, 1992).

Zea mays ssp. *parviglumis* (Iltis y Doebley) es un teosinte mayormente silvestre de flores pequeñas del sur y oeste de México (Doebley, 1990).



Fig. 2. Variación de cultivares locales, Valle Urubamba, Perú. Foto cortesía de Hugh Wilson, TAMU Herbarium, Universidad Texas A&M.



Fig 3. *Zea diploperennis*. Inflorescencia con estilos emergentes. Foto cortesía de Hugh Wilson, TAMU Herbarium, Universidad de Texas A&M.

Zea mays ssp. *huehuetenangensis* (Itlis y Doebley) Doebley es un teosinte muy poco distribuido de las colinas del oeste de Guatemala (Doebley, 1990).

Tripsacum: Las especies silvestres más cercanamente emparentadas al maíz, fuera del género *Zea*, pertenecen al género *Tripsacum*. El género *Tripsacum* está compuesto por 12 especies que son principalmente nativas de México y Guatemala pero que se encuentran distribuidas a lo largo de las regiones templadas de Estados Unidos y Sudamérica, con algunas especies presentes en Asia y el sudeste de Asia (Watson & Dallwitz, 1992). Todas las especies son gramíneas perennes de estación templada. Las especies de importancia económica para la agricultura en el sudoeste de Asia incluyen *T. dactyloides* (L.) L y *T. laxum* Scrib - Merr.

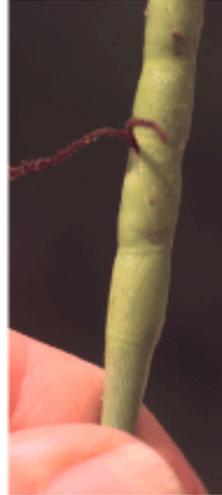


Fig. 4. *Tripsacum dactyloides*. Porciones pistiladas de la inflorescencia con estilos luego de la antesis (izquierda) y la porción estaminada de la inflorescencia (arriba). Foto cortesía de Hugh Wilson, TAMU Herbarium, Universidad de Texas A&M.

Tripsacum dactyloides (L.) L. (*Eastern gamagrass* o *pasto gama oriental*) es una gramínea de estación templada nativa de México y Guatemala pero que se encuentra actualmente distribuida ampliamente desde todo el hemisferio occidental hasta Malasia (FAO 2000d). El pasto gama es una gramínea perenne cespitosa vigorosa y que puede utilizarse como forraje nutritivo y sabroso para el ganado de pastoreo. Se lo planta extensivamente en las fincas de caucho de Malasia como un acondicionador del suelo, en pantanos drenados, y se lo utiliza como cubierta protectora. Se lo cultiva mundialmente como forraje y generalmente se lo maneja como un rodal.

T. dactyloides tiene un número haploide de cromosomas de $n=18$, con grados de ploidía que oscilan desde $2n=2x=36$ hasta $2n=6x=108$ (deWet et al. 1982, 1983). Las diferentes accesiones muestran ambas capacidades reproductivas, sexual y apomítica (asexual). *T. dactyloides* ha sido el objeto de trabajos de mejoramiento intensos para transferir la naturaleza reproductiva apomítica desde *Tripsacum* a *Zea mays* (Kindinger et al., 1995; Savidan et al., 1995).

T. laxum Scrib y Merr. (pasto de Guatemala) es una gramínea de estación templada nativa de América Central pero actualmente está distribuida extensamente en México, América del Sur, Sri Lanka y el sudeste de Asia hasta Fiji. Se usa como forraje en el sudeste asiático y se han informado usos como protector del suelo y formador de materia orgánica en las plantaciones de té (FAO 2000b). Es muy persistente pero menos productivo y de menor valor nutritivo en comparación con el pasto elefante (*elephant grass*, *Pennisetum purpureum*). No florece fácilmente y la producción de semillas es inusual excepto en su hábitat nativo. Se ha reportado a *T. laxum* como una especie de maleza importante.

T. andersonii Gray (Guatemala) es nativo de América Central y tiene 64 cromosomas. Se ha sugerido que es un híbrido entre *Zea luxurians* ($n=10$) y *Tripsacum latifolium* ($n=18$, $3x=54$) (Talbert et al., 1990). Tiene menor importancia como forraje (Watson & Dallwitz, 1992).

T. lanceolatum se encuentra en el sudoeste de Estados Unidos y a lo largo de Sierra Madre Occidental hacia el norte hasta Arizona. *T. floridanum* es nativo del sur de Florida y Cuba. A la especie *T. manisuroides* se la conoce sólo de Tuxtla Gutierrez, Chiapas, México (deWet et al., 1982, 1983).

Coix y otros géneros asiáticos: Los géneros asiáticos de la tribu Maydeae son oriundos de un área que se extiende desde India hasta el sudeste asiático y desde las islas de la Polinesia hasta Australia (Watson & Dallwitz, 1992). Incluyen *Coix* L. ($2n=10$, 20 y 40), *Sclerachne* R. Br. ($2n=20$), *Polytoca* R. Br. ($2n=20$ y 40), *Chionachne* R. Br. ($2n=20$), y *Trilobachne* Schenk y Henrard ($2n=20$).



Fig. 5. *Coix lacryma-jobi*. Foto cortesía de Hugh Wilson, TAMU Herbarium, Universidad de Texas A&M.

Las especies de estos géneros son anuales o perennes y se encuentran comúnmente en los márgenes de los bosques. Las especies de *Chionachne* y *Coix* también habitan en los márgenes de los arroyos, y hábitats abiertos y áreas pantanosas, respectivamente (Watson & Dallwitz, 1992).

Coix sp. es el género más conocido e incluye varias especies. La especie *Coix lacryma-jobi* Linn (lágrimas de San Pedro o lágrimas de Job) ($2n=20$) es originaria del sudeste de Asia y existe en forma silvestre y como razas cultivadas. También se encuentra en forma silvestre en África y Asia y en zonas templadas del Mediterráneo. Tiene amplia distribución en América del Norte, Central y del Sur. Las razas cultivadas en el sudeste asiático han sido seleccionadas para la calidad de grano que se pela fácilmente. El grano se hornea y luego se puede comer seco, usado en gachas y tortas, o procesado como harina. *C. lacryma jobi* también se cultiva como gramínea ornamental y las semillas se secan y usan como perlas en alhajas. Se ha citado que las especies del género *Coix* poseen cierto potencial de maleza (Watson & Dallwitz, 1992).

Chionachne incluye varias especies nativas del sudeste de Asia. La especie *C. semiteres* se cultiva como forrajera (Watson & Dallwitz, 1992).

El género *Polytoca* incluye unas pocas especies, de las cuales ninguna se cultiva comúnmente. Sólo una especie ha sido descrita dentro del género *Trilobachne* y no se conoce que se la cultive. Ambos géneros son nativos del sudeste de Asia (Watson & Dallwitz, 1992). Se ha citado previamente que el género *Sclerachne* incluye una especie (Soreng *et al.*, 2000).

Fecundación cruzada

El flujo génico desde el maíz puede ocurrir por dos medios: transferencia de polen y dispersión de la semilla. La dispersión de las semillas se controla fácilmente en el maíz ya que la domesticación ha eliminado todo mecanismo de dispersión de semilla que el maíz ancestral pudo haber usado (Purseglove, 1972). Los granos están firmemente sujetos al marlo y si la espiga se cae al suelo, las plántulas competidoras limitan su desarrollo (Gould, 1968).

El movimiento del polen es la única vía efectiva de escape génico desde las plantas de maíz. El polen se libera de la panoja de la parte superior de la planta y es transportado por el viento hacia las flores femeninas localizadas en el tallo. La dispersión del polen ocurre por un período de 14 días, con un pico durante los primeros 5 días de la dispersión (Sears, 2000). Los estigmas están receptivos durante gran parte de este intervalo de dos semanas (Kiesselbach 1980). Se ha observado que los insectos, tales como las abejas, colectan el polen desde las panojas del maíz, pero no juegan un rol importante en la polinización cruzada ya que las flores femeninas no ofrecen ningún atractivo en particular para ser visitadas (Rayor *et al.*, 1972). La velocidad y dirección del viento afectan la distribución del polen.

Las diferencias en las fechas de floración entre las variedades de maíz comerciales son pequeñas. Puede ocurrir la polinización cruzada entre variedades si se las crece en campos adyacentes. La viabilidad limitada del polen de maíz reduce el riesgo de polinización cruzada, ya que la planta receptora debe ser encontrada dentro de los 30 minutos en los que el polen permanece biológicamente activo. La polinización cruzada también es afectada por la concentración de polen de maíz liberado; el polen producido por un cultivo de maíz competirá exitosamente con fuentes foráneas de polen cuando se encuentre presente en concentraciones mayores (Rayor *et al.*, 1972).

El aislamiento de cultivos usando distancias de separación y barreras físicas son técnicas comunes para restringir el flujo génico y asegurar la pureza de las semillas para fines de producción de semillas. La polinización cruzada se controla en los lotes de semilla separando las distintas líneas. Los estándares de la OECD (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo) requieren un mínimo de 200 m (660 pies) de distancia de aislamiento para la producción de maíz. La distancia se ha estimado para mantener las líneas endocriadas con una pureza del 99,9%. Las barreras físicas, tales como los árboles o hileras de barrera, también son efectivas para reducir la polinización cruzada. La androcastración (corte de la panoja) o la cobertura de las panojas impiden efectivamente el movimiento de polen y limita el flujo génico.

El flujo génico desde el maíz (*Zea mays*) hacia otras especies del mismo género (interespecífico) y entre géneros (intergenérico) requiere, en primer lugar, la formación de un híbrido intermedio viable capaz de producir progenie fértil que pueda sobrevivir en una nueva generación. Asumiendo que existe compatibilidad sexual, otros factores también influyen en la probabilidad de hibridación: la proximidad entre el cultivo y las especies emparentadas, condiciones ambientales, y superposición de períodos de floración. La introgresión de genes del maíz hacia otras especies vegetales puede requerir varias generaciones de retrocruzamientos recurrentes.

Hibridación intraespecífica: Todas las formas de *Zea mays* spp *mays*, como el maíz dentado, el maíz dulce, el maíz pisingallo, realizan polinización cruzada formando híbridos fértiles (Pursglove, 1972).

Hibridación interespecífica: Todos los teosintes pueden cruzarse con el maíz y formar híbridos fértiles, excepto por el tetraploide *Z. perennis*. Los híbridos de maíz-teosinte tienen poca capacidad adaptativa y bajo impacto sobre la introgresión génica en generaciones subsiguientes (Galinat, 1988). La tendencia a formar híbridos naturales difiere entre los teosintes: *Z. luxurians* raramente hibrida con el maíz, mientras que *Z. mays* ssp. *mexicana* frecuentemente forma híbridos (Wilkes 1977). La información molecular confirma que hay flujo génico entre el maíz y el teosinte y sugiere que la introgresión de maíz y teosinte ocurre en ambas direcciones pero a bajos niveles (Doebly, 1990).

Hibridación intergenérica: Las especies de *Tripsacum* (*T. dactyloides*, *T. floridanum*, *T. lanceolatum*, y *T. pilosum*) han sido exitosamente cruzadas a mano con el maíz para formar híbridos. Los híbridos generalmente tienen 28 cromosomas, 10 del maíz y 18 del *Tripsacum*, y son androestériles, con una fertilidad femenina limitada (Mangelsdorf & Reeves, 1939, Mangelsdorf, 1974). La esterilidad es común en tales cruces lejanas a causa de las diferencias en el número de cromosomas y la falta de apareamiento entre los cromosomas (Eubanks 1997b).

Los primeros intentos de producir híbridos entre *Tripsacum* y teosintes anuales fracasaron (Mangelsdorf & Reeves 1939), sin embargo, hay investigaciones recientes que indican que cruces de *Tripsacum dactyloides* x *Zea diploperennis* producen híbridos fértiles en condiciones controladas (Eubanks 1995, 1997a,b). La fertilidad de los híbridos F1 fue de ~ 7% cuando se usó *Zea* como parental femenino y ~1% cuando se usó *Tripsacum* como parental femenino. Las retrocruzamientos subsiguientes con *Tripsacum* produjeron progenie fértil. El híbrido *Tripsacum-diploperennis* y la fertilidad cruzada con el maíz pueden ser un puente genético para la transferencia de genes de *Tripsacum* hacia el maíz (Eubanks 1997b).

Los estudios sobre los Maydeae asiáticos (*Coix*, *Sclerachne*, *Polytoca*, *Chionachne*, *Trilobachne*) son muy limitados y no se encontraron informes sobre la capacidad de estos géneros para cruzarse con *Zea mays* sp. *mays*. Los estudios genéticos usando análisis de isoenzimas indican que los géneros asiáticos son muy distintos al maíz y al teosinte (Katiyar & Sachan 1992). Los estudios cromosómicos entre maíz y *Coix* sp. revelaron fuertes diferencias estructurales entre estos genomas aunque el número de cromosomas (2n=20) es el mismo para ambos géneros (Katiyar *et al.*, 1992). La similitud en el número de cromosomas sugiere que podría haber posibilidad de que ocurra cruzamiento entre el maíz y los géneros asiáticos. Se han estudiado los géneros *Trilobachne*, *Chionachne* y *Coix* para realizar un relevamiento de

germoplasma para genes de resistencia a enfermedades de potencial uso en el maíz cultivado (Sharma *et al.*, 1995).

El maíz se cruza fácilmente con el trigo hexaploide (*Triticum aestivum*) con alta frecuencia de fertilización y desarrollo de embriones (los mejoradores usan el polen de maíz para desarrollar dobles haploides de trigo hexaploide). Sin embargo, los cromosomas del maíz son eliminados del genoma durante las etapas iniciales de meiosis y se obtienen embriones haploides (Laurie & Bennett, 1986). Hay poca evidencia que sugiera que los híbridos fértiles entre el maíz y el trigo hexaploide se puedan producir en la naturaleza. Han habido reportes sin aval de evidencia alguna sobre hibridación entre maíz y caña de azúcar (*Saccharum* sp.).

Cultivo del maíz

Requisitos generales del maíz

El maíz es uno de los cereales cultivados más ampliamente adaptados, sin embargo, su susceptibilidad a las heladas hace que el número de días de crecimiento sea el factor más importante y limitante en su producción. El maíz requiere una temperatura de suelo mínima de 12°C para que ocurra la germinación. A partir de la emergencia, el maíz crece óptimamente con una temperatura diurna promedio de 24°C y nocturna de 14-16°C. Por debajo de los 12°C el maíz no es biológicamente activo (Purseglove 1972). Se necesitan lluvias anuales adecuadas, entre 600 y 1000 mm, para la producción de maíz de temporada corta y precipitaciones adicionales para la producción de alta intensidad y donde existen temporadas de cultivo más duraderas (Purseglove 1972).

La densidad de siembra del maíz varía según las prácticas de producción. Cuando se usan pocos insumos y suelos pobres, el cultivo puede sustentar apenas unas 20.000 a 25.000 plantas por hectárea, mientras que en suelos muy fértiles y con muchos insumos de fertilizantes y pesticidas, puede soportar de 65.000 a 70.000 plantas por hectárea (Purseglove, 1972). Dependiendo de las condiciones ambientales y del propósito del cultivo, el ancho de las hileras puede variar de 25 a 105 cm, siendo 80 cm lo óptimo para producción comercial. Por ejemplo, cuando se cultiva el maíz para forraje, se usa alta densidad de plantas con surcos angostos para maximizar la producción de materia seca. Para asegurar una germinación pareja, el maíz debe ser plantado a una profundidad tal que la humedad esté presente en el suelo. Esto puede variar de 2 a 10 cm y hasta 25 cm en regiones áridas (Purseglove, 1972).

Para maximizar los rendimientos, se emplean varias prácticas tales como el uso de fertilizantes de nitrógeno y otros insumos, rotación de cultivos, y control de malezas. El maíz, especialmente la semilla híbrida, demanda grandes cantidades de nitrógeno para maximizar el crecimiento vegetativo y el rendimiento (Stoskopf 1985). La rotación del maíz con otros cultivos es esencial para reducir la presencia de enfermedades y plagas que permanecen en el suelo en el rastrojo del maíz (tallos y hojas) (Purseglove 1972). El control de las malezas es el elemento más importante para asegurar el rendimiento ya que la competencia de malezas al comienzo del ciclo puede reducir dramáticamente la productividad económica del cultivo de maíz. El control químico es el método de control de malezas más eficiente, aunque los costos pueden ser prohibitivos. El cultivo inter-surco previo al cierre del canopeo puede ser necesario si no se usan químicos, pero no siempre provee el control requerido para maximizar el rendimiento. El desmalezado manual es una opción, pero generalmente no es práctico para las grandes superficies de la producción comercial.

Producción de semilla

El maíz se cultiva como variedades mejoradas de polinización abierta (VPA), variedades híbridas, y razas locales que también son de polinización abierta.

Las VPA mejoradas son líneas endocriadas que se autopolinizan, en las cuales la mayoría de las características genéticas están fijadas en estado de homocigosis (Purseglove, 1972). La producción de semilla es relativamente simple, ya que el único requisito es el aislamiento con otras variedades para eliminar la introgresión génica de otras líneas. Las VPA pueden

mantenerse indefinidamente, asumiendo que no ocurre polinización cruzada. En la producción de variedades híbridas de maíz se usan líneas endocriadas superiores. Para fines de selección y evaluación de semilla, se mantienen las líneas endocriadas por medio de fertilización manual en surcos individuales. Los incrementos mayores de semilla de las líneas endocriadas se cultivan en bloques aislados para mantener la pureza y garantizar la autopolinización.

La producción de semillas híbridas es laboriosa en comparación con la de VPA, ya que involucra la producción y mantenimiento de líneas endocriadas en condiciones de aislamiento para producir la F1 o semilla híbrida (Stoskopf, 1985). El primer paso en la producción de semillas híbridas implica la selección de líneas endocriadas superiores que combinen bien, una consideración importante ya que las combinaciones pobres darán como resultado un híbrido con vigor reducido y menor rendimiento (Stoskopf, 1985). La producción a campo de semillas híbridas requiere que se planten dos líneas endocriadas parentales en un patrón tal que las hileras masculina (polinizador) y femenina (productor de semillas) ocurran en una proporción de 1:4 o una combinación similar (Freeling & Walbot, 1994). Esto asegura que se produzca suficiente polen para las plantas femeninas, pero no restringe demasiado la productividad del campo. Las hileras femeninas son androcastradas para impedir la auto-polinización y asegurar la fertilización por las plantas de las hileras masculinas. Los fitomejoradores comúnmente usan plantas femeninas con androesterilidad citoplasmática para impedir la producción de polen viable, reduciendo en gran medida las necesidades de laboreo (Freeling & Walbot, 1994).

En los países en desarrollo, las razas locales y las VPA mejoradas representan la mayoría del maíz cultivado (Mink & Dorosh 1985). Las razas locales y las VPA mejoradas generalmente son más baratas que las variedades híbridas y se pueden conservar las semillas para replantar en años siguientes. Los híbridos deben ser comprados todos los años ya que las semillas que se cosechen no producirán progenie uniforme cuando se las replanten al año siguiente. Las variedades híbridas de maíz comúnmente tienen mayor rendimiento que las razas locales o las VPA y muchas también tienen niveles superiores de resistencia a insectos y/o enfermedades.

El cultivo de maíz en el sudeste de Asia

El sudeste asiático tiene un clima tropical húmedo con variaciones regionales diferenciales en los niveles de precipitaciones. Las áreas agronómicas más productivas incluyen la península de Malasia, Borneo, Sumatra, Java Occidental y el este de Filipinas, ya que cuentan con abundantes precipitaciones durante todo el año. Otras regiones, aunque no tienen una estación seca pronunciada, usualmente reciben adecuada humedad, alrededor de 1.900 mm por año, para impedir que el suelo se seque completamente durante dicho período. Estas áreas comprenden la zona peninsular de Tailandia, la zona costera de Myanmar, Kampuchea, Sulawesi y Mindanao. Las áreas restantes del sudeste de Asia normalmente tienen menos de 1.500 mm de precipitaciones anuales, lo cual permite que el suelo se seque en esa parte del año (Capistrano & Marten, 1986).

Los tipos de suelo varían ampliamente dentro de la región del sudeste asiático. Oscilan desde suelo muy fértil adecuado para la agricultura intensiva, hasta suelos altamente erosionados por las condiciones climáticas, bajos en fertilidad. Generalmente, las áreas bajas son más fértiles debido a que son depositados los sedimentos provenientes de las tierras altas erosionadas, dejando a estas últimas menos productivas (Capistrano & Marten, 1986).

Los métodos de cultivo del maíz varían ampliamente en el sudeste asiático. El intercultivo ha sido una práctica tradicional, aunque la producción está cambiando hacia sistemas de monocultivo (Mink & Dorosh, 1985). La distribución espacial y temporal del maíz depende de las lluvias estacionales. La humedad es el factor limitante para estaciones adicionales de producción, aunque la mayoría de las áreas son aptas para producir dos cultivos de rendimiento razonable. El segundo cultivo, sembrado en enero o febrero, es generalmente de menor rendimiento ya que usualmente las lluvias son menores a medida que el cultivo se acerca a la madurez. Algunas áreas tienen un clima que les permite tres producciones continuas de maíz comenzando en octubre o noviembre por la principal. La tercera producción de maíz no es común en todas las áreas, pero los productores pueden utilizarla como un cultivo

de bajos insumos para mantener la subsistencia de efectivo en sus tierras (Mink & Dorosh, 1985).

Ecología del maíz en ecosistemas controlados y no controlados

El maíz como maleza

Durante el proceso de domesticación, el maíz perdió su capacidad de dispersar la semilla y de competir en ambientes no controlados por el hombre, y ahora depende enteramente de la intervención del hombre para su supervivencia (Gould, 1968). Las plantas guachas (o espontáneas) de maíz se originan a partir de cultivos comerciales, pero estas plantas generalmente no son competitivas y rara vez producen semillas viables para la campaña siguiente.

Ecología del suelo

Las interacciones del maíz con los microbios de la rizosfera incluyen a aquellas con bacterias, hongos, actinomicetes, protozoos y ácaros (Vega-Segovia & Ferrera-Cerrato, 1996 en OECD 1999). Existe evidencia de que algunos microorganismos pueden proteger al sistema radicular contra patógenos del suelo al competir eficientemente por los recursos. Las bacterias libres fijadoras de nitrógeno, como *Azotobacter*, *Beijerenckia* y *Azospirillum*, pueden proveer nitrógeno a las plantas de maíz por medio de relaciones simbióticas (González *et al.*, 1990). El maíz tiene una relación simbiótica con los hongos micorrizas que incrementa la capacidad de las plantas para adquirir fósforo (González-Chávez & Ferrera-Cerrato, 1996).

Interacciones con insectos

Muchos insectos consumen maíz durante su estación de cultivo. Éstos incluyen gusanos de la raíz (*Hollotrichia helleri*, *Aprosterna area*, *Leaucophalis rorida*) y gusanos alambre (*Elaterid* spp.) que atacan a las plántulas, orugas militares (*Laphygma* spp.) que atacan a las plantas un poco más grandes, y los barrenadores o taladros del maíz (*Ostrinia furnacalis*) que se alimentan de la planta cuando ésta está llegando a la madurez (Mink & Dorosh, 1985). El insecto que mayor daño le causa al maíz cultivado en el sudeste asiático es la oruga militar. Esta situación se puede ver facilitada por el intercultivo, ya que las poblaciones de oruga militar aumentan a medida que se alimentan de hospedadores alternativos. A medida que la producción de maíz cambia de intercultivo a monocultivo, la importancia de la oruga militar puede disminuir, aunque favoreciendo a otras plagas del maíz.

Interacciones con otras formas de vida silvestre

Además de soportar un sinnúmero de insectos y enfermedades que puedan estar presentes, el maíz puede eventualmente ser presa de predadores mayores. En el sudeste asiático los más problemáticos son el jabalí y las ratas. Juntos son responsables de las mayores pérdidas en la producción de maíz (Mink & Dorosh, 1985).

Tabla 4. Interacciones potenciales de *Zea mays* con otros organismos durante su ciclo de vida.

Organismo	Fecundación cruzada potencial	Organismo simbiótico/benéfico	Patógeno	Consumidor
<i>Z. mays ssp. mexicana</i>	X			
<i>Z. diploperennis</i>	X			
<i>Z. luxurians</i>	X			
<i>Z. mays ssp. huehuetenangensis</i>	X			
<i>T. dactyloides</i>	X			
<i>T. laxam</i>	X			
<i>T. andersonii</i>	X			
<i>T. lanceolatum</i>	X			
<i>T. floridanum</i>	X			
<i>T. manisuroides</i>	X			
<i>Coix spp</i>	NI			
<i>Schlerachne spp.</i>	NI			
<i>Polytoca spp.</i>	NI			
<i>Chinachne spp.</i>	NI			
<i>Trilobachne spp.</i>	NI			
<i>Saccharum spp.</i>	NI			
<i>Triticum spp.</i>	NI			
Hongos del suelo (Azotobacter spp., Beijerenckia spp., Azospirillum spp., Mycorrhizae spp.)		X		
<i>Pythium spp.</i> (podredumbre de la raíz)			X	
<i>Rhizoctonia spp.</i> (podredumbre de la raíz)			X	
<i>Fusarium spp.</i> (podredumbre de la semilla, grano, raíz, tallo)			X	
<i>Giberella spp.</i> (podredumbre del tallo)			X	
<i>Colletotrichum spp.</i> (antracnosis)			X	
<i>Helminthosporium spp.</i> (tizón foliar)			X	
<i>Setosphaeria spp.</i> (tizón foliar)			X	
<i>Erwinia spp.</i> (tizón foliar bacteriano)			X	
<i>Sclerospora spp.</i> (Downy mildew)			X	
<i>Puccinia spp.</i> (roya)			X	
<i>Sphacelothecia spp.</i> (carbón)			X	
<i>Ustilago spp</i> (carbón)			X	
<i>Holotrichia helleri</i> (gusanos de la raíz)				X
<i>Aprosterna area</i> (gusanos de la raíz)				X
<i>Hypomyces squamus</i> (gusanos de la raíz)				X
<i>Atheribona exigua</i> (moscas de la plántula)				X
<i>Laphygma spp.</i> (orugas militares)				X
<i>Agrotis spp.</i> (gusanos cortadores)				X
<i>Rhopalosiphum spp.</i> (áfidos)				X
<i>Ostrinia furnacalis</i> (barrenador asiático del maíz)				X
Aves				X
Cerdos salvajes				X
Ratas				X
Lombrices				X

X indica interacciones conocidas, NI indica que no hay información disponible que sustente o elimine posibles interacciones

1. Canadian Food Inspection Agency, 1994. Corn Biology Document <http://www.cfia-acia.agr.ca/english/plaveg/pbo/dir9411e.shtml>
2. González-Chávez, MC & Ferrera-Cerrato, R 1996. Ecología de la endomicorriza vesículo arbuscular en un agroecosistema sostenible de maíz en el trópico húmedo de México. Micol. Neotrop. Apl. 9:53-66
3. Laurie DA & Bennet MD 1986. Wheat x maize hybridization, Can. J. Genet. Cytol. 28:313-316
4. Mink, SD & Dorosh, PA 1985. An overview of corn production En: The corn economy of Indonesia. Cornell Univ Press, Londres.
5. Purseglove, JW 1972. Tropical crops: Monocotyledons 1. Longman Group Limited, Londres
6. Vega-Segovia, ML & Ferrera-Cerrato (eds) Avances de Investigación, área de microbiología de suelos. PROEDAF-IRENAT, Colegio de Posgraduados Montecillo, Estado de México
7. Watson L & Dallwitz MJ 1992, Grass genera of the World: Descriptions, Illustrations, Identification Retrieval, including Synonymus, Morphology, Anatomy, Phisiology, Cythology, Classification, Pathogens, World and Local Dstribution, and References. <http://biodiversity.uno.edu/delta>

Referencias

1. Calvo, R., Carrion, F., Aquino, P. & Heisey, P. (1998). The world maize economy: current issues. World Maize Facts and Trends 1997/1998. CIMMYT.
2. Capistrano A.D. & Marten, G.G. (1986). Agriculture in Southeast Asia. In: Traditional Agriculture in Southeast Asia; A Human Ecology Perspective. G.G. Marten (ed). Westview Press, Boulder, Co.
3. CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Centre) (2000). CGIAR Research, Areas of Research: Maize (*Zea mays* L.) <http://www.cgiar.org/areas/maize.htm>
4. deWet, J. M. J., Harlan, J.R. & Brink, D.E. (1982). Systematics of *Tripsacum dactyloides* (Gramineae). *Amer. J. Bot.* **69**, 1251- 1257.
5. deWet, J., Brink, D.E. & Cohen, C.E. (1983). Systematics of *Tripsacum* section *Fasciculata* (Gramineae). *Amer. J. Bot.* **70**, 1139- 1146.
6. Doebley, J. F. (1990). Molecular Evidence for Gene Flow among *Zea* species. *BioScience* **40**, 443-448.
7. Eubanks, M.W. (1993). A cross between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis*. *Maize Newsletter* **67**, 39.
8. Eubanks, M.W. (1995). A cross between two maize relatives: *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Economic Botany* **49**, 172-182.
9. Eubanks, M.W. (1997a). Further evidence for two progenitors in the origin of maize. *Maize Newsletter* **71**, 35-35.
10. Eubanks, M.W. (1997b). Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Theor. Appl. Genetics* **94**, 707-712.
11. FAO (2000a). FAOSTAT Database Records. <http://apps.fao.org/page/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&language=EN&hostname=apps.fao.org&version=default>.
12. FAO (2000b). Species Description. *Tripsacum laxum* Scrib. and Merr. <http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/agricult/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000336.htm>.
13. FAO (2000c). Species Description. *Zea mays* L. <http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/agricult/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000342.htm>
14. FAO (2000d). Species Description. *Tripsacum dactyloides* (L.) L. <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPC/doc/gbase/Data/PF000335.HTM>
15. Freeling M. & Walbot, V. (eds.). (1994). The Maize Handbook Springer-Verlag Inc., New York, USA.
16. Galinat, W.C. (1988). The origin of corn. In: Corn and Corn Improvement. Agronomy Monographs No.18. American Society of Agronomy, G.F Sprague and J.W. Dudley, (eds.). Madison, Wisconsin, pp. 1-31.
17. González Ch., M.C., Ferrera-Cerrato, R. García, R. & Martínez, A. (1990). La fijación biológica de nitrógeno en un agroecosistema de bajo ingreso externo de energía en Tamulte de las Sabanas, Tabasco. *Agrociencia. Serie Agua-Suelo-Clima.* **1**, 133-153.
18. González-Chávez, M.C. & Ferrera-Cerrato, R. (1996). Ecología de le endomicorriza vesículo arbuscular en un agrosistema sostenible de maíz en el trópico húmedo de México. *Micol. Neotrop. Apl.* **9**, 53-66.
19. Gould, F.W. (1968). Grass Systematics. McGraw Hill, N.Y., USA.
20. Hitchcock, A.S. & A. Chase. (1951). Manual of the Grasses of the United States (Volume 2). Dover Publications: N.Y. p. 790-796.
21. Hoisington, D., Listman, G.M. & Morris, M.L. (1998). Varietal development: applied biotechnology. In: Maize Seed Industries in Developing Countries. M. L. Morris (ed). Lynne Rienner Publishers, Inc. pp. 77-102.
22. Katiyar, S.K. & Sachan, J.K.S. (1992). Isozyme diversity in *Zea* and related genera. *Maize Newsletter* **66**, 92.
23. Katiyar, S.K., Chandel, G., Kumar, R. & Sachan, J.K.S. (1992). Karyological studies in Coix and maize. *Maize Newsletter* **66**, 90.
24. Kiesselbach, T.A. (1980). The structure and reproduction of corn. Reprint of: Research Bulletin No. 161. 1949. Agricultural Experiment Station, Lincoln, Nebraska. University of Nebraska Press. p. 93.
25. Kindiger, B., Sokolov, V. & Khatypova, I. (1995). Evaluation of apomictic reproduction in a set of 39 chromosome maize-tripsacum hybrids. USDA Agricultural Research Service. <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000006/16/0000061697.html>
26. Laurie, D.A. & Bennett, M.D. (1986). Wheat x maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* **28**, 313-316.

27. Mangelsdorf, P. C. & Reeves, R.G. (1939). The origin of Indian corn and its relatives. *Texas Agric. Expt. Sta. Bull.* **574**.
28. Mangelsdorf, P. C. (1974). *Corn: its Origin, Evolution and Improvement*. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
29. Mangelsdorf, P. C., Roberts, L.M. & Rogers, J.S. (1981). The probable origin of annual teosintes. *Bussey Inst., Harvard Univ. Publ.* **10**, 1- 69.
30. México, D.F. (1994). Maize seed industries revisited: emerging roles of the public and private sectors. *World Maize Facts and Trends 1993/94*. CIMMYT.
31. Mink, S. D. & Dorosh, P.A. (1987). An overview of corn production. In: *The Corn Economy of Indonesia*. Cornell University Press, London.
32. Morris, M. L. (1998). Overview of the world maize economy. In: *Maize Seed Industries in Developing Countries*. M. L. Morris (ed). Lynne Rienner Publishers, Inc. pp. 13-34.
33. OECD (1999). Draft Consensus Document on Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. <http://www.cimmyt.mx/research/abc/revisar/htm/consensus%20document.htm>
34. Poehlman, J.M. (1959). *Breeding Field Crops*. Holt, New York, USA.
35. Purseglove, J.W. (1972). *Tropical Crops: Monocotyledons 1*. Longman Group Limited., London.
36. Radu, A, Urechean, V., Naidin, C. & Motorga, V. (1997). The theoretical significance of a mutant in the phylogeny of the species *Zea mays* L. *Maize Newsletter* **71**, 77-78.
37. Rayor, G.S., Ogden, E.C. & Hayes, J.V. (1972). Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal* **64**, 420-427.
38. Savidan Y., Grimaneli D. & Leblanc O. (1995). Transferring apomixis from *Tripsacum* to maize: progress and challenges. Taba S. (ed.) *Maize Genetic Resources*. Maize Program Special Report. Mexico, D.F.: CIMMYT, pp.86-92.
39. Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E. & Matilla, H.R. (2000). Ecological impact of Bt corn pollen on Monarch butterfly in Ontario. Canadian Food Inspection Agency (<http://www.cfia-acia.agr.ca/english/plaveg/pbo/btmone.shtml>)
40. Sharma, R.C., Payak, M.M. & Sachan, J.K.S. (1995). Disease reaction of wild relatives of maize to *Erwinia* stalk rot and *Helminthosporium* leaf blight. **69**, 111-112.
41. Sharma, A.B. (1998). Experts for conservation of wild crop varieties. *The Financial Express*. Indian Express Group.
42. Soreng, R.J., Davidse, G., Peterson, P.M., Zuloaga, T.O., Judziewicz, E.J. & Filgueiras, T.S. (2000). *Catalogue of New World Grasses (Poaceae)*: <http://mobot.mobot.org/Pick/Search/nwgc.html>
43. Stoskopf, N.C. (1985). *Cereal Grain Crops*. Reston, Virginia: Reston Publishing Company, Inc., Prentice-Hall Company.
44. Talbert, L. E., Doebley, J.F., Larson, S. & Chandler, V.L. (1990). *Tripsacum andersonii* is a natural hybrids involving *Zea* and *Tripsacum*: molecular evidence. *Amer. J. Bot.* **77(6)**, 722- 726.
45. Vega-Segovia, M.L. & Ferrera-Cerrato, R. (1996). Microorganismos del rizoplano del maíz y frijol inoculados con mutantes de *Rhizobium* y *Azospirillum*. Pp. 9-17. In. J. Pérez-Moreno y R. Ferrera-Cerrato (Eds.) *Avances de Investigación, Área de Microbiología de Suelos*. PROEDAF-IRENAT, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
46. Watson, L. & Dallwitz, M.J. (1992). *Grass Genera of the World: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval; including Synonyms, Morphology, Anatomy, Physiology, Phytochemistry, Cytology, Classification, Pathogens, World and Local Distribution, and References*. Version:18th August 1999. <http://biodiversity.uno.edu/delta>
47. World Watch Institute (2000). Crop gene diversity declining. *Trends in Plant Science* **5**, 7.
48. Wilkes, H.G. (1977). Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. *Economic Botany* **31**, 254-293.



Apéndice 2 - Degradación aeróbica de la proteína Cry1Ab en el suelo

El núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (B.t.k.) HD-1 del maíz resistente al barrenador europeo del maíz (BEM) está presente en los tejidos vegetales que permanecen en el suelo luego de la cosecha. Los residuos post-cosecha son generalmente retirados con la labranza pero también pueden permanecer en la superficie del suelo hasta el año siguiente (siembra directa o labranza cero). El objetivo de este estudio fue evaluar el destino ambiental (disipación) de la proteína B.t.k. HD-1 de los tejidos de maíz luego de la cosecha.

Métodos

La tasa de disipación de la proteína B.t.k. HD-1 se estudió en tres sistemas: tejido de maíz resistente al BEM sin contacto con el suelo, tejido de maíz resistente al BEM en contacto con el suelo, y proteína B.t.k. HD-1 purificada mezclada con suelo. La disipación en estos tres sistemas se determinó midiendo la disminución en la bioactividad en insectos (gusano cogollero del tabaco) de muestras mantenidas bajo condiciones experimentales.

Se emplearon dos sustancias en el ensayo: la proteína B.t.k. HD-1 purificada de *E. coli*, que según estudios previos había resultado equivalente a la proteína B.t.k. HD-1 expresada en el maíz transgénico (Lee *et al.*, 1995), y polvo de tejido de maíz liofilizado preparado de plantas de maíz transgénicas MON80400 cultivadas en invernadero. MON80400 expresa la misma proteína B.t.k. HD-1 que la línea MON810 (Lee *et al.*, 1995), y fue usado en este estudio debido a sus altos niveles de expresión de la proteína. Se usó como control tejido liofilizado de plantas enteras de la línea parental no transformada Hi-II/B73.

Para las incubaciones de suelo se empleó suelo Drummer (29% arena, 46% limo, 25% arcilla, 3.1 % materia orgánica, pH 6.8 y capacidad de campo = 33.9%), un tipo de suelo representativo de las áreas productoras de maíz en Estados Unidos. La proteína B.t.k. HD-1 purificada se agregó al suelo en una concentración de 1,90 ppm, más de tres veces más que la máxima concentración esperada para las plantas de maíz resistentes al BEM en el campo, según el cálculo que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Estimación de la concentración de la proteína B.t.k. HD-1 en suelo.

Suposición #1	Incorporación uniforme post-cosecha de los residuos de las plantas de maíz en 15,24 cm de suelo.
Suposición #2	La densidad del suelo es 1g/cm ³
Suposición #3	<p>La mayor cantidad total estimada de la proteína HD-1 agregada a cada acre de suelo como componente de las plantas de maíz resistentes al barrenador europeo del maíz es 329g/acre (estudio No. 93-01-39-01).</p> <p>Estimación de los componentes de la proteína HD-1:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Peso fresco promedio de la planta en la senescencia=725g. 2. Proteína HD-1=11,35 ug/g peso fresco 3. Densidad de siembra=40.000 plantas/acre 4. (11,35 ug/g) x (725 g/planta) x (40.000 plantas/acre) x 10⁻⁶ = 329g <hr/> <p>1 acre=43.560 pies² 1 pie³ de suelo=1728 pulgadas³=28.317cm³ 21.780 pies³= 1 pie³ de suelo en 1 acre de 6 pulgadas de profundidad.</p>

Carga en suelo=329.000mg/(21.780 x 28.317 cm³) = 0,0005334 mg/ cm³=0,533 ug/ cm³= 0,533 ppm.

La cantidad de tejido de maíz agregado al suelo fue 2 a 3 veces el nivel máximo esperado para la concentración de tejido de maíz resistente al BEM en suelo en las condiciones basadas en el cálculo de la Tabla 2.

Tabla 2. Estimación de la concentración en suelo de tejidos de maíz resistente al barrenador europeo del maíz.

Suposición #1	Incorporación uniforme post-cosecha de los residuos de las plantas de maíz en 15,24 cm de suelo.
Suposición #2	La densidad del suelo es 1g/cm ³
Suposición #3	El volumen del suelo en 1 acre de 6 pulgadas de profundidad es = 21.780 x 28.317 cm ³
Suposición #4	El peso fresco promedio de cada planta resistente al barrenador europeo del maíz en la senescencia es 725g, lo que resulta en ~653 g [725 g x 0,90 ¹ de peso seco por planta].
Suposición #5	Densidad de siembra=40.000 plantas/acre 653 g peso seco/planta x 40.000 plantas/acre (21.780 x 28.317 cm ³) = 0,042 g MON 80400/peso seco de suelo.

1. En la senescencia, aproximadamente el 90% del peso total de la planta de maíz es materia seca.

Las muestras (control y prueba), para cada uno de los tres tratamientos, se incubaron a 24-27°C por hasta 43 días en condiciones de oscuridad, alta humedad y humedad relativamente constante en el suelo. Las incubaciones se finalizaron a tres intervalos de tiempo congelando las muestras a – 80 °C. La efectividad de la finalización a – 80 °C se estableció previamente (EPA MRID #43145215).

Luego de finalizar las incubaciones de las muestras de prueba y controles, se descongelaron las muestras, se llevaron a un volumen total de 20 ml con una solución de agar 0.20% y se las mezcló para formar una suspensión. Se preparó una dilución seriada (6,0 ml a 0,1 ml de suspensión) de cada suspensión de 20 ml. En el caso de las muestras del tratamiento en que hubo menos que 6,0 ml, se agregó la cantidad necesaria de material control para ajustar el volumen a 6,0 ml. Los controles negativos contenían 6,0 ml de material control. Un grupo de controles negativos consistió en el material control previamente incubado durante el mismo número de días que la muestra tratada. El segundo grupo de controles negativos consistió en material control no incubado (suelo + tejido, tejido solo, suelo solo) que fue preparado al mismo tiempo que la muestra del bioensayo.

Las muestras del tratamiento y controles se mezclaron en un volumen total de 30 ml de dieta artificial para insectos (King & Hartley, 1992). Esta mezcla se usó para alimentar larvas de primer estado del gusano cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*) (TBW). Las larvas se incubaron durante siete días a unos ~28°C y se determinó el promedio del peso de las larvas que sobrevivieron. La dosis subletal de la proteína HD-1 atrofia a las larvas, y se empleó la magnitud de la reducción del peso como un indicador del nivel de la bioactividad de la HD-1 en cada muestra. Este bioensayo es extremadamente sensible a bajas concentraciones de la proteína HD-1 que pueden ser ecológicamente significativas. El protocolo requirió datos del bioensayo de dos tubos, evaluados en días separados.

Se usaron el número total de larvas que sobrevivieron (réplicas de dos días diferentes, comenzando con n=48 larvas/día; sigma=96) y el peso total de sobrevivientes en ambas réplicas para calcular el peso promedio para cada tratamiento/concentración correspondiente a una fecha de incubación particular. Los DT50 (tiempo para reducir la bioactividad al 50%) y DT90 (tiempo para reducir la bioactividad al 90%) se calcularon usando un análisis de regresión e interpolación lineal para evaluar la disipación de la proteína B.t.k. HD-1.

Resultados

Las Tablas 3 – 5 resumen la persistencia de la bioactividad de la proteína HD-1 en el tiempo según el peso promedio de las larvas del gusano cogollero del tabaco expuestas al tejido del maíz MON80400 en el suelo (Tabla 3), al tejido del maíz MON80400 solo (Tabla 4) y a la proteína HD-1 purificada, en suelo (Tabla 5). La bioactividad de la proteína HD-1 en tejido incorporada en suelo disminuye con una vida media de 1,6 días y un DT90 estimado de 15 días

(Fig. 1). La bioactividad de la proteína HD-1 en tejido solo disminuye con una vida media estimada de 25,6 días y un DT90 estimado de 40,7 días (Fig. 2). La bioactividad de la proteína HD-1 purificada, en suelo, disminuye con una vida media estimada de 8,3 días y un DT90 estimado de 32,5 días (Fig. 3).

Tabla 3. Pesos promedios (mg) de las larvas del TBW (gusano cogollero del tabaco) expuestas a la proteína *B.t.k.* HD-1 como componente de la línea de maíz MON 80400 agregado a suelo "Drummer".

Muestra (día)	Dosis (ml) de solución agar (20ml) hecha con suelo + polvo de planta de maíz MON 80400							
	6,0	2,0	0,75	0,25	0,1	0,0 ¹	0,0 ²	0,0 ³
0	7,13	25,06	66,60	116,80	149,24	121,24	161,77	190,84
7	42,18	95,52	149,88	136,16	145,81	130,98	161,77	190,84
14	79,68	117,57	143,69	164,24	157,68	117,37	161,77	190,84
21	85,91	119,53	155,65	157,54	168,60	117,16	161,77	190,84
30	100,44	137,27	151,10	161,18	152,65	154,34	161,77	190,84
43	120,51	137,88	143,85	150,49	150,84	131,94	161,77	190,84

1. 6,0 ml de la muestra control incubada agregada a 24 ml de la dieta del insecto.
2. 6,0 ml del material control no incubado agregado a 24 ml de la dieta del insecto (rep 1).
3. 6,0 ml del material control no incubado agregado a 24 ml de la dieta del insecto (rep 2).

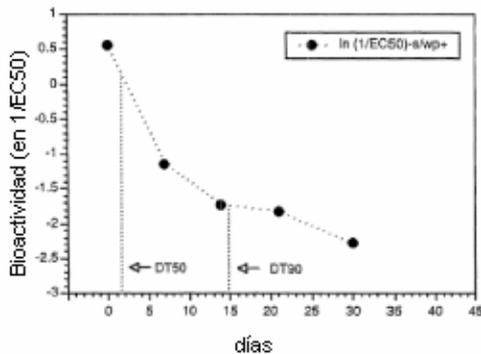


Fig. 1. Reducción en la actividad biológica (en 1/EC50) de la proteína HD-1 (del material de la planta) incorporada al suelo.

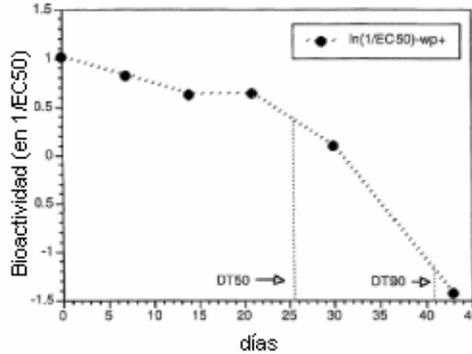


Fig. 2. Reducción en la actividad biológica (en 1/EC50) de la proteína HD-1 (del material de la planta) sin contacto con el suelo.

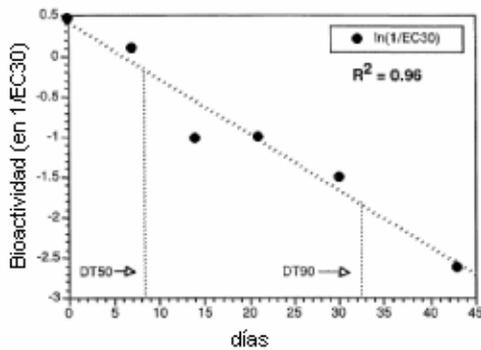


Fig. 3. Reducción en la actividad biológica (en 1/EC30) de la proteína HD-1 purificada incorporada al suelo.

Tabla 4. Pesos promedios (mg) de las larvas del TBW (gusano cogollero del tabaco) expuestas a la proteína *B.t.k.* HD-1 como componente de la línea de maíz MON 80400 sin contacto con el suelo.

Muestra (día)	Dosis (ml) de solución agar (20ml) de polvo de hoja de maíz MON 80400							
	6,0	2,0	0,75	0,25	0,1	0,0 ¹	0,0 ²	0,0 ³
0	5,89	21,92	45,67	116,45	163,23	182,53	181,73	190,26
7	5,33	21,47	64,93	106,84	147,14	138,21	181,73	190,26
14	9,41	31,47	71,65	116,42	132,83	132,83	181,73	190,26
21	11,03	34,51	76,83	118,26	129,69	148,81	181,73	190,26
30	15,60	48,45	107,75	126,77	160,77	156,77	181,73	190,26
43	71,28	121,15	168,48	167,34	181,11	148,86	181,73	190,26

1. 6,0 ml de la muestra control incubada agregada a 24 ml de la dieta del insecto.
2. 6,0 ml del material control no incubado agregado a 24 ml de la dieta del insecto (rep 1).
3. 6,0 ml del material control no incubado agregado a 24 ml de la dieta del insecto (rep 2).

Tabla 5. Pesos promedios (mg) de las larvas del TBW (gusano cogollero del tabaco) expuestas a la proteína *B.t.k.* HD-1 purificada incorporada al suelo.

Muestra (día)	Dosis (ml) de solución agar (20ml) hecha con suelo + proteína HD-1 purificada							
	6,0	2,0	0,75	0,25	0,1	0,0 ¹	0,0 ²	0,0 ³
0	36,19	93,49	118,52	144,14	139,45	186,19	150,54	182,17
7	74,39	113,69	122,64	144,52	147,46	174,34	150,54	182,17
14	99,23	130,47	143,05	138,32	143,76	167,81	150,54	182,17
21	97,18	142,26	149,40	157,57	141,33	180,07	150,54	182,17
30	113,18	134,51	156,87	151,60	157,21	176,24	150,54	182,17
43	133,61	163,16	163,83	195,58	183,34	189,84	150,54	182,17

1. 6,0 ml de la muestra control incubada agregada a 24 ml de la dieta del insecto.
2. 6,0 ml del material control no incubado agregado a 24 ml de la dieta del insecto (rep 1).
3. 6,0 ml del material control no incubado agregado a 24 ml de la dieta del insecto (rep 2).

La bioactividad de la proteína *B.t.k.* HD-1 en tejido de maíz resultó estable en las condiciones de almacenamiento a -80°C empleadas en el ensayo. Los datos demuestran que la mayor parte de la bioactividad de la proteína HD-1 en el tejido de maíz puede ser detectada cuando el material vegetal se incorpora al suelo. La bioactividad del tejido del maíz MON 80400 fue estable cuando se almacenó solo o en suelo por al menos 75 días a ~ -80°C. Por el contrario, la cantidad de proteína HD-1 purificada recuperada fue menor que el 20%. Esto pudo deberse a que la proteína HD-1, en bajas concentraciones, resulta inestable frente al almacenamiento a -80°C y/o a la unión de la proteína purificada a la arcilla y componentes orgánicos del suelo (Tapp *et al.*, 1994).

Conclusiones

Los resultados de este estudio sugieren que la proteína *B.t.k.* HD-1, como componente del material vegetal del maíz resistente a insectos que queda luego de la cosecha, se disipa rápidamente de la superficie del suelo. La tasa de disipación en suelo es comparable a la informada para las formulaciones microbianas Bt y para el algodón transgénico que expresa la proteína *B.t.k.* HD-73 (Palm *et al.*, 1994, EPA MRID # 43145215).

Referencias

1. EPA MRID # 43145215. Ream, J. E., Sims, S.R. & Leach, J.N. (1994). Aerobic soil degradation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 protein bioactivity. Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13267.
2. King, E. G. Jr. & Hatley, G. G. (1992). Multiple-species insect rearing in support of research. In: *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management* (eds. Anderson, T. E. and Leppla, N.C.). Westview Press. pp. 159-172
3. Lee, T.C., Bailey, M.R., Sims, S.R., Zeng, J., Smith, C.E., Shariff, A., Holden, L.R. & Sanders, P.R. (1995). Assessment of the equivalence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein produced in *Escherichia coli* and European corn borer resistant corn. Monsanto Technical Report MSL-13864, St. Louis. Study Number 94-01-39-09.
4. Palm, C.J., Donnegan, K., Harris, D. & Seidler, R. (1994). Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology* **3**, 145-151.
5. Tapp, H., Calamai, L. & Stotzky, G. (1994). Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry* **26**, 663-679.



Apéndice 3 - Toxicidad potencial de la proteína Cry1Ab para especies no blanco

Adultos de abeja melífera (*Apis mellifera* L.)

Este estudio se realizó para evaluar la potencial toxicidad del núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab (HD-1) de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (B.t.k.) para la abeja melífera adulta (*Apis mellifera* L.), un insecto polinizador benéfico. Se eligió este estudio ya que se prevé que la ingesta potencial de las proteínas B.t.k. en el polen y néctar será la ruta primaria de exposición de las abejas. Se utilizó una dosis de riesgo máxima. La concentración nominal máxima de la proteína B.t.k. HD-1 ensayada fue mayor a 10 veces la sensibilidad LC50 estimada de varios lepidópteros plaga blanco a la proteína B.t.k. HD-1 (Macintosh *et al.*, 1990).

Métodos

Se usaron abejas adultas de uno a siete días, obtenidas de un proveedor comercial, y elegidas al azar de los marcos localizados dentro de las cámaras de cría. Los recipientes de prueba consistieron en un mallado metálico y de tela sólido de 3,2 mm con tapas removibles y un orificio circular. El material de prueba se introdujo en las cámaras usando viales de vidrio ajustados con un cordón de algodón insertados a presión en la cámara a través del orificio circular. Cada recipiente de prueba, que contenía aproximadamente 40 abejas, constituía una réplica. Cada grupo de tratamiento y control tenía tres réplicas. El día de inicio de la prueba, las abejas fueron escogidas a mano y colocadas dentro de cada recipiente al azar. Los recipientes fueron colocados en un cuarto de cultivo que mantenía una temperatura de aproximadamente 24-27°C y una humedad relativa de 30-80%. Los grupos controles fueron: grupo control negativo (si proteína B.t.k. HD-1), grupo control de proteína B.t.k. HD-1 atenuada por calor, y control de evaporación de una mezcla jarabe agua:miel (sin abejas). El grupo de tratamiento fue el grupo con proteína B.t.k. HD-1.

La dieta de prueba se preparó el día 0 agregando el material de prueba a una mezcla 50:50 (vol:vol) de miel:agua de modo de lograr una concentración nominal de 20 ppm de la proteína B.t.k. HD-1 en la dieta. Dos dietas controles (20 ppm proteína B.t.k. HD-1 atenuada por calor y control negativo) se prepararon y administraron de la misma manera que la dieta de prueba. Luego de la preparación, las dietas fueron conservadas a < 16°C y se suministraron frescas a las abejas cada 24 horas. Las muestras de las dietas preparadas en el día 0 se congelaron y analizaron para determinar la estabilidad/bioactividad de la sustancia de prueba. Se determinó para cada grupo el consumo de dieta estimado promedio en cada cambio de dieta.

Resultados

Las abejas adultas fueron observadas dos veces: el día de inicio del ensayo para determinar mortalidad y signos de toxicidad y posteriormente una vez por día. El ensayo se finalizó el día 9 cuando la mortalidad del control negativo excedió el 20%. Al final del estudio, la mortalidad acumulada fue del 22,3% para el grupo control negativo, 32,5 para el control B.t.k. HD-1 atenuada por calor, y 16% para el grupo de proteína B.t.k. HD-1 (Tabla 1). La diferencia en la mortalidad acumulada entre los grupos de prueba y control no fue estadísticamente significativa. La mortalidad hallada el día 9 no se consideró como asociada a los efectos del tratamiento ya que la proteína B.t.k. HD-1 es biológicamente activa dentro de las 24-48 horas de la ingestión en los insectos susceptibles. Todas las abejas sobrevivientes fueron normales en apariencia y comportamiento durante el período del ensayo. Los análisis de la estabilidad/bioactividad de la sustancia de prueba demostraron que la proteína B.t.k. HD-1 fue utilizada en, o cercana a, la concentración de dosis apropiada.

Tabla 1. Mortalidad porcentual de abejas adultas (días 1 a 9).

Tratamiento	Mortalidad media por día								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
No tratados (sólo dieta)	0	0,81	2,46	4,13	4,13	5,77	9,90	18,96	22,28
Dieta + HD-1 (20ppm)	0,76	4,71	7,12	7,95	10,4 1	12,05	12,89	14,55	16,20
Dieta + HD-1 atenuada (20ppm)	0,79	1,59	1,59	3,91	7,13	15,82	19,79	25,42	32,59

Conclusión

La LC50 para la proteína B.t.k. HD-1 en adultos de abeja melífera (*Apis mellifera*) es superior a 20 ppm, la mayor dosis ensayada. La concentración en la cual no se observaron efectos fue 20 ppm.

Larvas de abeja melífera (*Apis mellifera* L.)

Este estudio se realizó para evaluar la potencial toxicidad de la proteína B.t.k. HD-1 para las larvas de abeja melífera (*Apis mellifera* L.), un insecto polinizador benéfico. Se utilizó en este estudio una dosis de riesgo máxima. La concentración nominal máxima de la proteína B.t.k. HD-1 ensayada fue mayor a 10 veces la sensibilidad LC50 estimada de varios lepidópteros plaga blanco a la proteína B.t.k. HD-1 (Macintosh *et al.*, 1990, Hofte *et al.*, 1988).

Métodos

Se obtuvo una cohorte de larvas de abeja de “edad pareja” permitiendo que la abeja reina oviponga en los marcos de la cámara de cría durante 1-3 días y a continuación se transfirieron los marcos al alza melaria (excluida de reina). El ensayo se realizó con larvas de 1-4 días de edad dentro de las celdillas en estos últimos marcos. Cada marco individual, que contenía al menos 50 abejas larvas, constituía una réplica. Cada tratamiento y grupo control tuvo tres réplicas. Dos réplicas por cada tratamiento se iniciaron el día uno y la tercera réplica en un día separado. La dosis se obtuvo colocando 5 µl de la sustancia de prueba en agua destilada o agua destilada sola en pocillos con las larvas. Luego de colocar la dosis, los marcos tratados fueron devueltos al alza melaria para completar el desarrollo larval.

La dieta de prueba se preparó el día 0 agregando el material de prueba a agua destilada de modo de lograr una concentración nominal de 20 ppm de la proteína B.t.k. HD-1 en la dieta. El grupo de tratamiento fue el que contenía la proteína B.t.k. HD-1. Los grupos controles fueron: agua destilada sin B.t.k. HD-1, proteína B.t.k. HD-1 atenuada por calor y control sin tratar. Las muestras de las dietas preparadas en el día 0 se congelaron y analizaron para determinar la estabilidad/bioactividad de la sustancia de prueba. Las abejas adultas que emergían de las celdas operculadas fueron colocadas en jaulitas para adultos diariamente. Cuarenta y ocho horas luego de que la última abeja adulta emergiera del tratamiento control, se detuvo el conteo de emergentes de los restantes tratamientos. Se compararon entre los cuatro tratamientos los porcentajes de supervivencia larval (desde el dosaje hasta la emergencia de adultos) y de supervivencia de adultos post-emergentes.

Resultados

El porcentaje promedio de supervivencia de larvas en el 1er a 2do estadio larval hasta el operculado osciló entre el 65% y 94% para todos los tratamientos (38-100% en cada réplica, Tabla 2). La supervivencia desde el operculado hasta la emergencia de los adultos fue del 100% para todos los tratamientos. La supervivencia de adultos desde la post-emergencia hasta el final del ensayo osciló entre el 92% y 96% para los cuatro tratamientos (84-100% para las

réplicas, Tabla 3). Las diferencias en mortalidad entre los tratamientos, dentro de los grupos de larvas y de post-emergentes respectivamente, no fueron significativas. Todas las abejas adultas supervivientes fueron normales en apariencia y comportamiento. Los análisis de la estabilidad/bioactividad de la sustancia de prueba demostraron que la proteína B.t.k. HD-1 activa fue utilizada en, o cercana a, la concentración de dosis apropiada.

Tabla 2. Sobrevida de las larvas desde el momento del dosaje hasta la formación del opérculo de las celdillas

Tratamiento	Rep. #	No. operculadas/50 abejas	% sobrevida al momento del operculado
Sin tratar (sólo dieta)	1	33	66
	2	47	94
	3	44	88
Agua destilada	1	19	38
	2	50	100
	3	29	58
HD-1 (20ppm)	1	31	62
	2	41	82
	3	47	94
HD-1 atenuada por calor (20 ppm)	1	49	98
	2	49	98
	3	43	86

Tabla 3. Sobrevida de los adultos desde la emergencia hasta el final del ensayo

Tratamiento	Rep. #	No. total emergentes	No. total muertos	% sobrevida de adultos
Sin tratar (sólo dieta)	1	42	4	90
	2	52	1	98
	3	43	0	100
	Media	45,7	1,7	96,0
Agua destilada	1	21	0	100
	2	50	6	88
	3	30	2	93
	Media	33,7	2,7	93,7
HD-1 (20ppm)	1	62	2	97
	2	44	7	84
	3	50	3	94
	Media	52	4	91,7
HD-1 atenuada por calor (20 ppm)	1	51	1	98
	2	52	7	87
	3	58	3	95
	Media	53,7	3,7	93,3

Conclusión

La LC50 para la proteína B.t.k. HD-1 en larvas de abeja melífera (*Apis mellifera*) es superior a 20 ppm, la mayor dosis ensayada. La concentración en la cual no se observaron efectos fue 20 ppm. La mayoría de la mortalidad observada ocurrió entre el dosaje y el operculado. Aparentemente la variación existente se debió más a las diferencias entre alzas melarias individuales que a las diferencias entre tratamientos.

Codornices (*Colinus virginianus*)

El objetivo de este estudio fue evaluar la salubridad del alimento derivado del maíz resistente al barrenador europeo del maíz (BEM) de la línea MON80187 cuando se lo administra a codornices (las aves se pueden alimentar de semillas de maíz que quedan en el campo luego de la cosecha). Dado que las codornices jóvenes son tradicionalmente utilizadas en estudios de alimentación de aves, se consideró más factible alimentar a las codornices con alimento de maíz crudo incorporado en sus dietas más que con semillas intactas, que son relativamente grandes y difíciles de ingerir por las aves jóvenes.

Métodos

Se obtuvieron polluelos de codorniz nacidos de la misma camada a partir de una bandada de producción. Diez polluelos de codorniz de sexo mixto y de diez días de edad se asignaron aleatoriamente a cada grupo de tratamiento y alojados en grupos de diez aves/corral. Cada grupo de tratamiento fue alimentado con concentraciones dietarias de 5% (p/p) (nominal 50.000 ppm) y 10% (p/p) (nominal 100.000 ppm) de harina de maíz cruda que fue directamente mezclada a la ración de las aves. El nivel dietario suministrado fue elegido en base a los resultados de un estudio piloto de alimentación de codornices realizado con harina cruda de maíz de una línea parental. La semilla cruda de maíz resistente a insectos y parental fue molida a harina para permitir el consumo por parte de las codornices jóvenes y para facilitar el mezclado homogéneo de la harina de maíz con la dieta básica.

Se ensayaron la línea de prueba (MON80187) y la línea control (MON80087). También se incluyó en el estudio un grupo control adicional de dieta básica (sin el agregado de harina de maíz) de treinta aves. Cada grupo fue alimentado con la dieta tratamiento o control durante 5 días y luego fueron transferidos a dieta basal (no suplementadas) durante los 3 últimos días del ensayo. Se proveyó agua y alimento *ad libitum*. Se registró el consumo de alimento de cada corral que contenía la totalidad de las aves a prueba para cada grupo. El consumo de alimento se midió durante los días 1, 2, 3, 4, 5 y 6-8 y se presentaron como un estimativo debido al desperdicio inevitable por parte de las aves. El peso corporal individual fue registrado al inicio del estudio, en el día 5 y al final del estudio. Las aves se observaron al menos dos veces al día durante el estudio para determinar mortalidad o signos de toxicidad.

Resultados

No hubo mortalidad en ninguno de los grupos ensayados. Todas las aves fueron normales en apariencia y comportamiento durante el período de estudio. No hubo diferencias aparentes en el peso corporal o en el consumo de alimento entre las aves alimentadas con MON80187 y MON80087 (Tabla 4). El consumo de una dieta que contiene el 10% p/p de harina cruda de maíz equivale a 138 semillas/peso corporal/día.

Tabla 4. Peso corporal promedio y cambios en el peso corporal promedio en codornices durante el estudio de toxicidad aguda con MON 80187.

Grupo experimental	Concentración (ppm)	Período de exposición		Período post-exposición			
		Día 0	Cambio (g)	Día 5	Cambio (g)	Día 8	Cambio total (g)
Dieta basal	0	20±3	8	28±4	10	38±6	18
	0	19±2	8	26±3	10	36±5	17
	0	21±3	9	30±6	10	41±8	20
MON80087	50.000	20±3	10	30±4	10	41±5	20
	100.000	20±3	8	28±3	10	38±5	18
MON80187	50.000	20±3	11	31±3	10	41±4	21
	100.000	20±3	10	29±5	8	38±6	18

Conclusiones

No ocurrió mortalidad en las aves alimentadas con hasta 10% (p/p) (nominal 100.000 ppm) de MON80187 en la dieta. La concentración de no observación de efectos fue mayor al 10% p/p. En base a los parámetros medidos, la salubridad de la harina de maíz de la línea resistente al BEM (MON 80187) fue comparable con la de la línea control cuando se la suministró en la dieta de las codornices.

Daphnia

Los dáfidos son representativos de un grupo importante de invertebrados acuáticos y fueron seleccionados como una especie de prueba indicadora para evaluar la toxicidad aguda del polen de maíz que contiene la proteína Cry1Ab. En base a un historial de uso pasado y a la facilidad de su conservación en laboratorio, se escogió *Daphnia magna* para este ensayo, el cual involucró un período de exposición de 48 horas en condiciones de prueba de renovación estática.

Métodos

Los neonatos de *Daphnia* fueron expuestos a una dosis única de polen de maíz que contenía la proteína Cry1Ab (100 mg de polen prueba/l). Se incluyeron dos grupos control: un grupo expuesto a una única dosis de polen de maíz (100 mg polen control/l) proveniente de una línea de maíz no modificada genéticamente, y un grupo control de ensayo de dáfidos mantenidos solamente en una dilución de agua. Se mantuvieron tres cámaras de prueba réplica para los grupos de prueba y controles, con 10 dáfidos neonatos en cada cámara y un total de 30 dáfidos neonatos por concentración de prueba. La concentración nominal de polen (ambos control y de prueba) fue 100 mg/l en base a los lineamientos guía de la EPA (EE.UU.) para pruebas de límites (US EPA, 1985).

Los dáfidos fueron aleatoriamente asignados a las cámaras de prueba al inicio del ensayo. Se hicieron observaciones de mortalidad/inmovilidad y otros signos clínicos de toxicidad aproximadamente a las 2, 24 y 48 horas luego de comenzado el ensayo. Dado que fue una prueba de límites, los valores de EC50 no se pudieron definir estadísticamente y por lo tanto fueron estimados a partir de los datos de respuesta biológica. Se utilizó la prueba estadística exacta de Fisher para determinar si la mortalidad/inmovilidad en la concentración límite (100 mg polen prueba/l) fue estadísticamente diferente ($p \neq 0,05$) de la del grupo control.

La sustancia de prueba fue polen de maíz Bt11 que contiene la proteína Cry1Ab en una concentración aproximada de 1,25 ng/mL de proteína vegetal (Pilacinski & Williams, 1995). Se eligió el polen de maíz línea Bt11 porque contiene el mayor nivel de proteína Cry1Ab entre varias líneas comerciales. La sustancia control fue polen de una línea de maíz no transgénico

con fondo genético similar al de Bt11. La sustancia de prueba contenía cerca del 97,9% de polen y el resto era material extraño como partes de anteras y de insectos. La sustancia control contenía cerca del 96,2% de polen. Al inicio del ensayo, se verificaron las muestras de las sustancias de prueba y control para determinar su actividad biológica contra especies de lepidópteros plaga susceptibles. Los resultados de dicho estudio indicaron que la sustancia de prueba era biológicamente activa.

Las sustancias de prueba y control se agregaron directamente al agua de manantial antes de agregar los organismos. Se ajustaron las soluciones para el porcentaje de polen en las sustancias de prueba y control y representaron concentraciones nominales de 100 mg de polen control/l y 100 mg de polen de prueba/l, respectivamente. Las soluciones de prueba del control de ensayo se prepararon agregando agua de manantial a las cámaras de prueba. Luego de la adición de las sustancias control y de prueba, las soluciones fueron mezcladas vigorosamente. Se inició aireación suave y se agregaron los dáfidos 30 minutos después. Las soluciones fueron renovadas aproximadamente a las 24 hs y los dáfidos se transfirieron de las soluciones viejas a las nuevas.

Resultados

Las observaciones diarias de mortalidad, inmovilidad y otros signos clínicos observados durante el ensayo se muestran en la Tabla 5. No se observaron mortalidad ni efectos comportamentales en ninguno de los tratamientos luego de 3,5 horas y 24 horas de exposición. A las 48 horas, dos dáfidos estaban muertos en el control de ensayo, lo que representa 7% de mortalidad. Este nivel de mortalidad control está dentro del rango aceptable (US EPA, 1985). Todos los dáfidos sobrevivientes parecieron normales. A las 48 horas, un dáfido fue encontrado muerto/inmóvil (3%) en ambos tratamientos de polen prueba y control. Los dáfidos sobrevivientes parecieron normales. Se estimó que estas mortalidades no estaban relacionadas con la exposición al polen. En base a estos resultados, se estima que la EC50 es superior a 100 mg de polen prueba/l. La prueba exacta de Fisher indicó que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos control y entre los grupos control y el de sustancia a prueba ($p > 0.05$).

Tabla 5. Porcentaje acumulado de mortalidad/inmovilidad y efectos relacionados con el tratamiento.

Conc. nominal	Rep	Daphnia/Rep	3,5 horas			24 horas			48 horas			% inmóv. y muertas
			muertas	inmóviles	efectos	muertas	inmóv	efectos	muertas	inmóv	efectos	
Ensayo control	A	10	0	0	10AN	0	0	10AN	1	0	9AN	7
	B	10	0	0	10AN	0	0	10AN	0	0	10AN	
	C	10	0	0	10AN	0	0	10AN	1	0	9AN	
100mg de polen control	A	10	0	0	10AN	0	0	10AN	0	0	10AN	3
	B	10	0	0	10AN	0	0	10AN	1	0	9AN	
	C	10	0	0	10AN	0	0	10AN	0	0	10AN	
100mg polen test	A	10	0	0	10AN	0	0	10AN	0	0	10AN	3
	B	10	0	0	10AN	0	0	10AN	0	1	9AN	
	C	10	0	0	10AN	0	0	10AN	0	0	10AN	

AN: apariencia normal

Conclusiones

El valor de EC50 de 48 horas estimado para *Daphnia magna* expuesto a la proteína Cry1Ab en el polen de maíz fue >100 mg polen prueba/l. No hubo efectos observados relacionados al tratamiento en la concentración límite de 100 mg polen prueba/l.

Lombriz de tierra (*Eisenia fetida*)

El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de la proteína insecticida Cry1Ab administrada a lombrices de tierra durante un período de exposición de 14 días en un sustrato de suelo artificial.

Métodos

Se seleccionaron trescientas veinticinco lombrices adultas (*Eisenia fetida*) y se colocaron en un recipiente de sustrato de suelo artificial preparado (70% arena, 20% arcilla Kaolin y 10% turba *sphagnum*) ajustado a un contenido de humedad aproximado de 33% durante una aclimatación de 24 horas. En el día 0 del ensayo, las lombrices fueron aleatoriamente distribuidas de a pares en grupos de 10, pesadas, colocadas sobre la superficie del suelo en cada cámara de prueba y se observó su comportamiento de entierro. Al mismo tiempo se mantuvo un grupo control de tres grupos adicionales de lombrices expuestas a cloroacetamida en el suelo a concentraciones de 15, 30 y 60 mg a.i./kg de suelo seco. Se usaron cuatro cámaras de prueba réplicas para cada grupo tratamiento y control. Las lombrices no fueron alimentadas durante el ensayo. En los días 7 y 14 del ensayo, los contenidos de cada cámara de prueba fueron vaciados y se contó el número de lombrices sobrevivientes. También se observaron las lombrices para detectar alguna anomalía comportamental. Se mantuvo un registro de mortalidad y cualquier signo de toxicidad o comportamiento anormal. En el día 7, luego de las observaciones, el suelo artificial fue devuelto a las cámaras de prueba y las lombrices se colocaron sobre la superficie del suelo para observar su comportamiento de entierro. En el día 14 las lombrices fueron sacrificadas luego de realizar las observaciones y determinar el peso corporal.

La concentración nominal de prueba a la cual se expusieron las lombrices fue de 200 miligramos de proteína insecticida Cry1Ab por kilogramo de suelo seco. En el día 0 se colectaron muestras de la sustancia de prueba y de la suspensión de agua desionizada usadas en la preparación de los suelos control para confirmar las concentraciones. Al inicio y final del ensayo, se colectaron muestras de suelo de cada grupo tratamiento y control y se los usó para medir el pH y el contenido de humedad inicial y final del suelo. Las concentraciones de prueba no se ajustaron por la pureza de la sustancia prueba, por lo tanto todas las concentraciones y los valores de LC50 se informaron como miligramos de sustancia prueba por kilogramo de suelo seco (mg/k). El porcentaje de mortalidad acumulada en el grupo tratamiento se utilizó para determinar el valor de LC50 al final del ensayo. La concentración en la cual no hubo observación de efectos fue determinada por análisis visual de la mortalidad, peso corporal y observaciones clínicas.

Resultados

La concentración nominal de la proteína Cry1Ab activa de la sustancia de prueba en la suspensión estuvo en, o cercana a, la concentración esperada de 1,07 mg/ml, y fue estimada en 1,31 mg/ml.

Los datos de las observaciones semanales de mortalidad de lombrices y otros signos de toxicidad se muestran en la Tabla 6. En el grupo control hubo 8% (3 de 40) de mortalidad en el día 7 del ensayo, y 15% (6 de 40) en el día 14. En el grupo tratamiento de 200 mg/kg, hubo 13% (4 de 40) de mortalidad en el día 7 del ensayo y 25% en el día 14. Tres de las cuatro réplicas en el grupo tratamiento de 200 mg/kg tubo mortalidades comparables con las del grupo control, mientras que en la cuarta réplica ocurrió 50% (5 de 10) de mortalidad, representando un 50% de la mortalidad total del grupo tratamiento. El incremento en la mortalidad en el grupo tratamiento de 200 mg/kg al final del ensayo no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) en comparación con el grupo control. Todas las lombrices sobrevivientes en ambos grupos control y tratamiento 200 mg/kg tuvieron apariencia y comportamiento normal a lo largo del período de ensayo. Excepto por una lombriz del grupo control en el día 0, las lombrices no mostraron aversión hacia el suelo. Una lombriz del grupo control permaneció en la superficie del suelo el día 0, mientras que todas las otras lombrices de los grupos control y tratamiento estaban por debajo de la superficie del suelo luego de aproximadamente una hora de haberlas colocado

sobre la superficie en los días 0 y 7. EL peso corporal de los grupos fue medido por réplicas en los días 0 y 14. A partir de las medidas grupales, se calcularon los pesos promedios individuales (Tabla 7). El cambio en el peso corporal fue variable entre las réplicas individuales, sin embargo, no parece haber habido efectos en el peso corporal relacionados el tratamiento durante el ensayo.

Tabla 6. Mortalidad acumulada y observaciones en lombrices expuestas a la proteína insecticida Cry1Ab en un sustrato de suelo artificial.

Concentración de suelo nominal (mg/kg)	Rep.	Día 7		Día 14		Mortalidad Rep. (%)	Mortalidad Grupal (%)
		No. muertas ¹	Efectos ²	No. muertas ¹	Efectos ²		
0 (control)	A	0/10	10AN	1/10	9AN	10	15
	B	1/10	9AN	3/10	7AN	30	
	C	1/10	9AN	1/10	9AN	10	
	D	1/10	9AN	1/10	9AN	10	
200	A	1/10	9AN	2/10	8AN	20	25*
	B	1/10	9AN	2/10	8AN	20	
	C	2/10	*	5/10	5AN	50	
	D	1/10	9AN	1/10	9AN	10	

1. Los datos de mortalidad se presentan como el número de muertas sobre el número de expuestas.

2. Número de lombrices que mostraron signos clínicos; AN: apariencia y comportamiento normales.

3. *Diferencia no estadísticamente significativa ($p>0,05$), cuando se comparan con el grupo control

La prueba de control positiva se realizó al mismo tiempo que la prueba definitiva con la proteína insecticida Cry1Ab. El valor de LC50 para las lombrices expuestas a cloroacetamida en el sustrato artificial de suelo se determinó por probabilidad binomial con interpelación no lineal en 17 mg a.i./kg suelo seco, con un intervalo de confianza del 95% de 15 a 30 mg a.i./kg suelo seco. Los resultados son concordantes con aquellos observados en ensayos previos.

Tabla 7. Pesos corporales promedios de lombrices expuestas a la proteína insecticida Cry1Ab en un sustrato de suelo artificial.

Concentración nominal de suelo (mg/kg)	Rep	Pesos corporales individuales (mg)		
		Día 0	Día 14	Cambio total
0 (control)	A	330	320	-10
	B	340	370	+30
	C	370	360	-10
	D	330	300	-30
200	A	360	360	0
	B	360	440	+80
	C	380	480	+100
	D	320	370	+50

Conclusiones

Se determinó que el valor de LC50 de 14 días para lombrices expuestas a la proteína insecticida Cry1Ab en un sustrato de suelo artificial fue superior a 200 mg/kg de suelo seco, la única concentración ensayada. La concentración en la cual no se observaron efectos fue de 200 mg/kg de suelo seco.

Collembola

Los colémbolos son insectos que habitan en el suelo y tienen un rol importante en este ecosistema debido a que se alimentan de material vegetal en descomposición. Los colémbolos podrían estar posiblemente expuestos a la proteína Cry1Ab en el tejido del maíz que queda en el campo luego de la cosecha. El propósito de este ensayo fue determinar si el colémbolo (*Folsomia catiti*) podría ser negativamente afectado por la endotoxina Cry1Ab expresada en las plantas de maíz.

Métodos

Los colémbolos fueron expuestos a dietas modificadas con tejido vegetal de maíz MON810 que contiene la proteína Cry1Ab (sustancia de prueba) y tejido vegetal de maíz MON823 sin la proteína Cry1Ab (sustancia control) durante 28 días. Se ensayaron tres niveles de tratamiento de cada material vegetal: 50%, 5.0% y 0.5% de material vegetal liofilizado. No se incluyeron niveles de prueba mayores al 50% de material vegetal liofilizado porque la dieta resultante no sería óptima para la supervivencia y desarrollo de los colémbolos. Se usó tiodicarb, un insecticida carbamato, como sustancia de referencia en cinco concentraciones de tratamiento: 10.000 ppm, 1.000 ppm, 100 ppm, 10 ppm y 1 ppm. Se realizó un control de ensayo simultáneamente en el que se proveyó a los colémbolos levadura de Brewer sin adicionar ningún material.

La dieta para las concentraciones de los tratamientos con sustancias de referencia, control y de prueba fueron preparadas mezclando los materiales con levadura de Brewer (comida estándar para los colémbolos) sobre la base del peso corporal hasta alcanzar las concentraciones deseadas. Se realizaron cuatro réplicas, cada una consistía en un vaso de prueba con 10 u 11 colémbolos juveniles. Los vasos de prueba con los colémbolos se acomodaron en un diseño en bloques completamente aleatorizado en oscuridad a 24°C. La humedad relativa en los vasos con colémbolos fue lo suficientemente alta para permitir el crecimiento y desarrollo normal aunque el porcentaje real no se midió. La dieta de prueba y el agua se agregaron a cada vaso de prueba *ad limitum* cada dos o tres días. Se evaluó visualmente la supervivencia luego de 7, 14, 21 y 28 días. En esos días también se realizaron observaciones adicionales con respecto a efectos de impedimento de crecimiento, producción de huevos y eclosión de huevos. Cuando se observó presencia de huevos en los vasos, ésta fue registrada, al igual que la presencia de colémbolos inmaduros. Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas usando procedimientos estadísticos paramétricos estándar.

La concentración estimada de la proteína Cry1Ab en el tejido foliar por técnicas de ELISA fue de 50,6 ug/g en material liofilizado y de 6,27 ug/g en tejido fresco. La bioactividad de la proteína Cry1Ab fue verificada al comienzo del ensayo determinando el efecto de la mayor concentración ensayada (50% sustancia de prueba y 50% levadura) sobre el crecimiento y supervivencia del gusano cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*). La estabilidad de la sustancia de prueba durante el período de exposición de 28 días se determinó realizando bioensayos sobre *H. virescens* con el material de prueba que había estado congelado durante los 28 días de prueba, excepto cuando se lo había sacado del congelador para alimentar a los colémbolos.

Resultados

No hubo mortalidad de colémbolos asociada con la exposición a la sustancia de prueba que contenía Cry1Ab (MON810), con la sustancia control (MON 823), o con el control de ensayo (Tabla 8). Se observó que el material vegetal desaparecía a través del tiempo en los vasos de prueba con colémbolos, evidencia indirecta de que los colémbolos ingerían el material que se les había presentado en este ensayo. La reproducción de los colémbolos no se afectó significativamente por exposición a la sustancia de prueba en comparación con el control (Tabla 8). La producción media para ambas sustancias de prueba y control mostró una tendencia mayor que la observada en el control de ensayo, sin embargo la diferencia no fue significativa.

Tabla 8. Mortalidad y producción total de colémbolos luego de 28 días de exposición al maíz MON 810, al maíz control MON 823 y al control del ensayo (100% levaduras).

Tratamiento	% en la dieta	% mortalidad	Total de colémbolos*
MON 810	50,0	0	403 (70)
	5,0	0	430 (75)
	0,5	0	376 (23)
MON 823	50,0	0	371 (86)
	5,0	0	408 (63)
	0,5	0	390 (116)
Control del ensayo	100% levaduras	0	337 (43)

* Media y desvío estándar (n=4) del número total de colémbolos en el recipiente del ensayo al final de la prueba (incluye adultos y juveniles).

Los datos de progenie se sometieron a la prueba de Barlett para varianza no homogénea y a la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal. Como los datos cumplieron los requisitos de normalidad y homocedacia, se usó la prueba de Dunnett para evaluar los datos PROC ANOVA en SAS). La sustancia de referencia, tiodicarb, produjo efectos mesurables sobre la supervivencia y producción de los colémbolos (Tabla 9). Todos los colémbolos expuestos a niveles de tratamiento de 10.000 y 1000 ppm del estándar tiodicarb murieron dentro de los 14 días. En el menor nivel de tiodicarb de 1,0 ppm, no hubo mortalidad. La producción total de colémbolos se redujo en todos los niveles de tratamiento de la sustancia de referencia. La menor concentración de tiodicarb produjo un 65% de reducción en la producción en comparación con el control de ensayo. Los resultados de esta prueba confirman que este ensayo puede detectar los efectos de los cambios en la dieta.

Tabla 9. Mortalidad y producción total de colémbolos luego de 23 días de exposición a la sustancia de referencia, tiodicarb, y al control del ensayo (100% levaduras).

Tratamiento	Tiodicarb en la dieta (ppm)	% Mortalidad*	Total de colémbolos**
Control del ensayo (100% levaduras)	0	0(0)	337 (43)
Tiodicarb	1	0(0)	117 (27)
	10	7,5(15)	65 (2)
	100	45(33)	14 (12)
	1.000	100(0)	0(0)
	10.000	100(0)	0(0)

*Media y desvío estándar (n=4) para la sobrevivencia de los colémbolos adultos al final del ensayo.

** Media y desvío estándar (n=4) del número total de colémbolos en el recipiente del ensayo al final de la prueba (incluye adultos y juveniles).

Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que, incluso a muy altos niveles de tratamiento, los colémbolos no fueron afectados por la exposición crónica a la proteína Cry1Ab de las plantas. Luego de la exposición al material de prueba en su dieta durante 28 días, no hubo mortalidad ni reducción en el número de progenie. La dieta de prueba que contiene la proteína Cry1Ab fue sometida a un bioensayo al inicio y final del ensayo para verificar su bioactividad y al final del ensayo tenía aparentemente la mitad de actividad. La dieta se descongeló cuando se removían las alícuotas para agregar nuevas en los vasos de ensayo. El congelamiento y descongelamiento de las muestras produce la degradación de las proteínas y puede haber contribuido a la disminución de la actividad

Crisopas verdes

Este estudio se realizó para evaluar la potencial toxicidad de la proteína B.t.k. HD-1 para la crisopa verde (*Chrysopa carnea*), un predador de insectos benéfico que comúnmente se encuentra en la mayoría de las plantas que son hospedantes de otros insectos.

Métodos

Las larvas de crisopa verde se compraron a un proveedor comercial y al recibirlas se conservaron a temperatura y humedad ambiente hasta el día 0 del ensayo. Al inicio del ensayo, las larvas fueron colocadas en tazas de plástico, de a una larva por taza. La temperatura ambiente durante el ensayo osciló entre 21-25°C con una humedad relativa promedio de 72%. Hubo 30 larvas para cada tratamiento: control negativo; control de proteína B.t.k. HD-1 atenuada por calor; y proteína B.t.k. HD-1.

Las dietas de prueba fueron preparadas diluyendo una cantidad calculada de proteína HD-1 tripsinizada activa en agua de ósmosis reversa para preparar en solución de reserva que fue mezclada con huevos de polilla (*Sitotroga sp.*) para crear una pasta. La concentración nominal de la proteína B.t.k. HD-1 que cubría los huevos de polilla fue de 20 ppm. Dos intentos previos de preparar polen sustituto como una fuente de alimento que fue remojado en la solución acuosa de 20 ppm B.t.k. resultaron fallidos debido a la alta mortalidad en los controles. Las crisopas aparentemente no se alimentan de polen mojado como sustituto. Las dietas del ensayo fueron preparadas frescas diariamente y suministradas a las larvas sobre unos bloques plásticos colocados en las tazas. El grupo control negativo fue alimentado con huevos de polilla mezclados solamente con agua de ósmosis reversa. El grupo control de proteína fue alimentado con huevos de polilla cubiertos con 20 ppm de proteína B.t.k. HD-1 atenuada por calor. Muestras de las dietas de prueba preparadas en el día 0 y de las restantes dietas de prueba de alimentación de larvas y la solución de reserva fueron congeladas previamente para análisis.

Las larvas fueron observadas dos veces durante el primer día del ensayo para analizar mortalidad y signos de toxicidad y posteriormente una vez por día. El ensayo finalizó el día 7 cuando la pupación en el control negativo excedió el 20%.

Resultados

Al final del ensayo no hubo mortalidad en el control negativo, el control atenuado por calor ni en el grupo con proteína B.t.k. HD-1 (Tabla 10). EL porcentaje de pupación en cada grupo al día 7 fue de 33% (control negativo), 47% (control atenuado por calor) y 87 % (grupo proteína B.t.k. HD-1). Los análisis de bioactividad/estabilidad de la sustancia prueba mostraron que la proteína activa B.t.k. HD-1 en la solución de reserva era estable bajo condiciones de envío/almacenado. La concentración en la solución de reserva determinada analíticamente resultó comparable con la concentración nominal de 16,7 ppm. Aunque la concentración deseada debería haber sido 20 ppm, por un error de cálculo en el procedimiento para cubrir los huevos de polilla, la concentración real fue aproximadamente de 16,7 ppm. Se analizó la solución de reserva del día 0 en lugar de los huevos de polilla, dado que el bioensayo está diseñado para medir niveles de B.t.k. en soluciones acuosas y no como cobertura de huevos de polilla.

Tabla 10. Mortalidad acumulada de larvas de crisopas verdes expuestas a la proteína B.t.k HD-1 durante 7 días (por triplicado)

Tratamiento	Rep. 1	Día de la prueba									Mortalidad acumulada combinada	% Mortalidad
		0 ²	0 ³	1	2	3	4	5	6	7		
Control Neg.	A	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(2)	0(3)	0/30	0%
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0(3)		
	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0(4)		
Control atenuado	A	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	0/30	0%
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0(5)		
	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0(5)		
Tratamiento (16,7ppm)	A	0	0	0	0	0	0	0	0(3)	0(8)	0/30	0%
	B	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(1)	0(8)		
	C	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(1)	0(10)		

1. Cada tratamiento incluyó a 30 larvas de crisopas verdes.
 2. Primera observación inmediatamente después de la dosis
 3. Segunda observación 30 minutos después de la dosis.
- () indica larvas pupas

Conclusiones

No hubo evidencia de que la crisopa verde fuera afectada negativamente cuando se la alimentó con huevos de polilla cubiertos con una concentración nominal de 16,7 ppm de proteína B.t.k. HD-1 durante 7 días. En las condiciones del bioensayo, la LC50 fue superior a 16,7 ppm de proteína B.t.k. HD-1. La concentración a la cual no se observaron efectos fue de 16,7 ppm.

Referencias

1. Hoxter, K.A. & Lynn, S.P. (1992a). Activated Btk HD-1 protein: a dietary toxicity study with parasitic Hymenopteran (*Brachymeria intemedica*). Study Number WL-92-157, an unpublished study conducted by Monsanto Company and Wildlife International Ltd. EPA MRID no. 43468004.
2. Hoxter, K.A. & Lynn, S.P. (1992b). Activated Btk HD-1 protein: a dietary toxicity study with ladybird Beetles. Study Number WL-92-156, an unpublished study conducted by Monsanto Company and Wildlife International Ltd. EPA MRID no. 43468005.
3. MacIntosh, S.C., Stone, T.B. Sims, S.R., Hunst, P., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, F.J., Fischhoff, D.A. & Fuchs, R.L. (1990). Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Insect Path.* **56**, 258-266.
4. Pilacinski, W.P. and Williams, D.G. (1995). Petition for determination of nonregulated status for insect protected corn (*Zea mays* L.) expressing the CryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Northrup King.
5. United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1985). Standard Evaluation Procedure, Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates. Hazard Evaluation Division. Office of Pesticide Programs. EPA 540/g-85-005. Washington, D.C.



Glosario

ADN-T

Segmento de ADN del plásmido inductor de tumor (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* que es transferido dentro del núcleo de las células infectadas, donde se integra en el genoma hospedador y se transcribe.

Antisentido

Hebra de ADN que es complementaria al ARN mensajero

Bordes izquierdo y derecho

Secuencias repetidas de 25 pb que flanquean los extremos izquierdo y derecho del fragmento de ADN-T y que actúan como una señal en *cis* para la maquinaria de transferencia

Concatémeros

Serie de genes unidos covalentemente

EMBL

Laboratorio de Biología Molecular Europeo (*European Molecular Biology Laboratory*), que cuenta con muchos recursos de bioinformática, incluyendo alineamiento de secuencias aminoacídicas y bases de datos de estructura de proteínas.

<http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html>

Epigenética

Estudio de los mecanismos que producen efectos fenotípicos a partir de la actividad génica durante la diferenciación y el desarrollo.

GenBank

Centro Nacional para la Información en Biotecnología (*National Centre for Biotechnology Information*) de Estados Unidos. Cuenta con bases de datos públicas, incluyendo bases de datos de proteínas. La base de datos de proteínas contiene información de las secuencias traducidas a partir de las regiones codificantes de las secuencias de ADN que se encuentran depositadas en el GenBank, EMBL y DDBJ, además de secuencias de proteínas presentadas a PIR, SWISSPROT, PRF, Protein Data Bank (PDB) (secuencias de estructuras resueltas).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>

Integrón

Aquella parte de una construcción genética que se integra en el genoma receptor.

Isogénico

Grupo de líneas que son genéticamente idénticas

Metilación de citosinas

Unión de un grupo metilo a residuos de citosinas en el ADN de los eucariontes y que resulta en la formación de 5-metilcitosina

Número de copias

Número de copias de un transgén que se integraron en el genoma del organismo receptor

Péptido señal de tránsito al cloroplasto

Péptido de tránsito que, al estar fusionado a una proteína, actúa transportando dicha proteína al cloroplasto en una célula vegetal.

PIR

Base de datos internacional de secuencias proteicas (*International Protein Sequence Database de Protein Information Resource*) que contiene información acerca de todas las proteínas que se encuentran en la naturaleza y cuya estructura primaria se conoce.

<http://www-nbrf.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/pirpsd.html>

Poliadenilación

Adición de una secuencia de múltiples adeninas (poliA) en el extremo 3' de un ARNm eucariota luego de la transcripción.

Potenciador (*enhancer*)

Secuencia de ADN que actúa en *cis* y que incrementa la utilización de algunos promotores eucariontes, y que puede funcionar en cualquier orientación y localización (secuencia arriba o secuencia abajo) con respecto al promotor.

Promotor

Secuencia de ADN que se encuentra al principio de un gen y que controla su expresión. Los promotores son necesarios para que la ARN polimerasa se una e inicie la transcripción.

Secuencia del vector plasmídico

Secuencia de ADN plasmídico que se encuentra por fuera de un marco de lectura abierto y que no se traduce a proteína.

SwissProt

Base de datos de secuencias proteicas anotadas, establecida en 1986 y mantenida en colaboración por el *Swiss Institute for Bioinformatics* (SIB) y el *European Bioinformatics Institute* (EBI). <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

Tocoferoles

Cualquiera de los alcoholes que constituyen la vitamina E de la dieta. Se los encuentra en alimentos tales como el aceite de germen de trigo, el aceite de semilla de algodón, la lechuga, la espinaca y la yema de huevo.