

***PARTE VI***  
***Manejo responsable***  
***de la tecnología***



## VI. CAPÍTULO 1

### Bioseguridad y Regulación de Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (OVGM)

Clara Rubinstein

#### Criterios Científicos para la Evaluación de la Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

La plasticidad intrínseca de los genomas vegetales les confiere una alta adaptabilidad a las plantas, y es fuente de un alto potencial de variabilidad genética. Las tecnologías de mejoramiento de variedades tradicionalmente utilizadas trabajan sobre esta base, e introducen diferentes tipos de modificaciones genéticas, que actualmente están siendo identificadas y caracterizadas en detalle.

Las tecnologías de ADN recombinante se han sumado a las de mejoramiento convencional durante los últimos 30 años. Sin embargo, presentan características propias que se han considerado lo suficientemente novedosas a nivel de las organizaciones internacionales que han recomendado su regulación. Las características de un organismo vegetal genéticamente modificado (OVGM) son estudiadas y evaluadas desde las etapas más tempranas de su desarrollo desde el punto de vista de su bioseguridad. Para ello, se utiliza un Enfoque Comparativo, descrito por primera vez en el contexto de los OVGM, en un documento de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) de 1993. Este enfoque, así como los criterios científicos utilizados para su implementación, son presentados en este capítulo, con énfasis en la inocuidad para el consumo

A lo largo de la historia, los mejoradores han apelado a todo tipo de tecnologías para generar diversidad genética, de la cual poder seleccionar aquellas características deseadas. En los capítulos y secciones anteriores se han des-

cripto las más recientes, que se suman a otras, utilizadas durante siglos con el mismo fin.

La aplicación de las técnicas de ADN recombinante al mejoramiento vegetal en la década de 1980, sin embargo, marcan un punto de inflexión, dada las preocupaciones que han generado en diferentes ámbitos y posteriormente, también debido a su impacto en la percepción pública, en especial en la Unión Europea.

El National Research Council de los EEUU, publicó en 1989 un informe en el cual analiza las diferencias entre el mejoramiento tradicional y las nuevas biotecnologías para la modificación genética de plantas y microorganismos. En este informe, se incluye a las tecnologías de ADN recombinante como parte integrante de la secuencia de los avances del conocimiento y de la tecnología científica, a lo largo de 10.000 años de desarrollo humano. (NRC, 1989, ver Fig 1). También concluyen en que "Las mismas leyes físicas y biológicas gobiernan la respuesta de los organismos modificados por los modernos métodos moleculares y celulares y aquellos producidos por métodos clásicos"

Al mismo tiempo, organismos internacionales como FAO y OMS (la Organización para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud, respectivamente), se han ocupado de la bioseguridad de las nuevas tecnologías aplicadas a la producción de

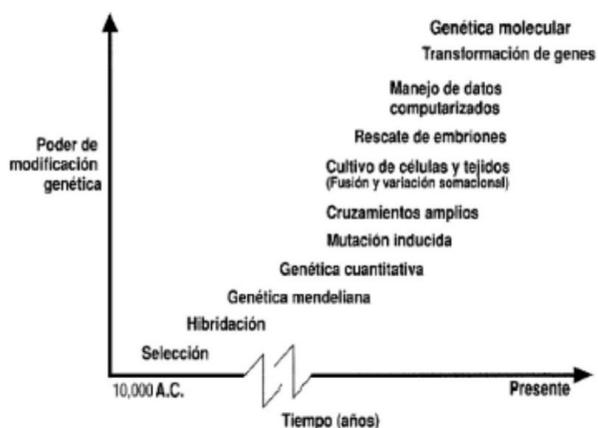


Figura 1. Aumento en la capacidad de modificación genética a través del tiempo

Fuente: Informe de Expertos del IFT (2000), adaptado de NRC, 1989

alimentos. Asimismo, el Codex Alimentarius (FAO-OMS) ha desarrollado recomendaciones generales para la evaluación de la inocuidad.

Como se mencionó anteriormente, todas las especies mejoradas por el hombre, son de un modo u otro, "genéticamente modificadas". A pesar de esto, la aplicación de las técnicas de ingeniería genética a la producción de alimentos ha sido considerada lo suficientemente nueva y diferente, como para justificar el control de su desarrollo e implementación.

Esto tiene sus antecedentes en las primeras etapas del desarrollo de la ingeniería genética, en los años 70. En 1974 y 1975, los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH) convocan a las **Conferencias de Asilomar** (California); este fue el primer paso para la creación de políticas para el control de la seguridad de organismos recombinantes. Desde allí, y en todo el mundo, han evolucionado estas políticas y las regulaciones que controlan el desarrollo de nuevos organismos y sus productos mediante técnicas de ADN recombinante.

Estas regulaciones, se basan en criterios científicos y también empíricos, en particular, en lo que hace a la seguridad de los alimentos. Aunque los alimentos tradicionalmente disponibles en las diferentes culturas **se aceptan como seguros**, se sabe que algunos pueden ser tóxicos, según la parte de la planta que se consume (por ejemplo el tallo se puede consumir, pero no así las hojas o las raíces) o el estadio de su desarrollo (papas verdes). También hay alimentos de origen vegetal que deben ser cocinados para ser seguros (por ej. legumbres), así como sabemos que hay grupos de alimentos que pueden provocar alergias en individuos sensibles (maní, leche, nueces, huevo, soja).

En 1986 la OECD (Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica) convoca a reuniones de expertos que reúnen sus recomendaciones en el llamado "Blue Book". Más adelante, en 1993, OECD resumió estos conceptos: *"La seguridad de los alimentos para consumo humano se basa en que **debe existir una certeza razonable** de que no resultará daño alguno del uso debido bajo las condiciones de consumo anticipadas. Históricamente, los alimentos preparados y utilizados bajo las condiciones tradicionales han sido considera-*

*dos seguros , por su historia de uso y experiencia, aún cuando pudieran contener tóxicos naturales o anti-nutrientes . En principio, los alimentos se han considerado seguros, a menos que un peligro significativo se haya podido identificar"*

En este capítulo, se intentará dar un panorama de los criterios científicos que se utilizan internacionalmente para evaluar la seguridad de los cultivos transgénicos, también llamados genéricamente OGM (Organismos Genéticamente Modificados).

### **1. El análisis de riesgos y la identificación del peligro**

Se ha establecido que el análisis de riesgos, consta de tres etapas fundamentales:

**La identificación del peligro** : es la identificación y cuantificación de un efecto adverso, en general a partir de ensayos experimentales, por ejemplo de tipo toxicológico, en modelos animales.

**Valoración de la exposición**: estimar cuánto, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo se está expuesto a dicho peligro.

**Caracterización del riesgo**: es la estimación que surge de evaluar el peligro en función de la exposición y evaluar diferentes escenarios de exposición máxima, para establecer qué grado de exposición es aceptable en cuanto a la seguridad.

Este proceso se aplica a casos muy diferentes, y existe amplia experiencia en su aplicación a la evaluación de riesgos para aditivos alimentarios, agroquímicos y compuestos específicos en general. En esos casos, es relativamente simple someter cantidades exactas y conocidas de un compuesto a ensayos toxicológicos clásicos en modelos animales, o evaluaciones de residuos en alimentos, aguas, suelos, etc. De esta forma, se establecen parámetros como el **NOAEL** (por *No Adverse Effect Level*), que es **el nivel de exposición en el que no se observan efectos adversos**. Este da una medida de la peligrosidad del compuesto: **cuanto mayor el NOAEL, menor el potencial tóxico del compuesto**. Basándose en el NOAEL, es posible estimar un **nivel de exposición seguro**, que define el **ADI (dosis**

**diaria aceptable, expresada por kg de peso corporal)** y que dependiendo del tipo de sustancia y otras variables, suele estar unas 100 veces por encima del NOAEL. Este factor de multiplicación se conoce como **margen de seguridad para la exposición**.

Sin embargo, estos principios no son tan directamente aplicables al análisis de riesgos para OVGMs o sus derivados de uso alimentario, ya que constituyen mezclas complejas, que contienen miles de compuestos, macro y micro nutrientes, tóxicos naturales (compuestos tóxicos que están naturalmente presentes en la especie), antinutrientes (compuestos que inhiben la absorción o biodisponibilidad de algunos nutrientes), metabolitos secundarios, etc.

Por lo tanto, la evaluación de estos cultivos es más una **evaluación de seguridad o inocuidad** más que un análisis de riesgos "clásico", ya que hasta ahora no se han determinado peligros cuantificables en los OGMs estudiados. De hecho, en la práctica, en caso de identificarse efectos adversos, estos cultivos no se autorizarían para su salida al mercado.

Por todo lo anterior, se ha desarrollado para los OGMs un enfoque que ha sido utilizado para otros casos de alimentos y que se basa en la **comparación del nuevo alimento o cultivo con el tradicionalmente utilizado y considerado seguro**. Este enfoque se ha desarrollado consensuadamente con la colaboración de diferentes organismos internacionales (OECD, FAO, OMS, International Life Sciences Institute o ILSI) que periódicamente convocan a paneles de expertos que revisan y actualizan las recomendaciones de acuerdo a los avances tecnológicos y el estado del conocimiento.

## **2. El Enfoque Comparativo y la Equivalencia Sustancial**

En 1993 la OECD formuló el concepto de **Equivalencia Sustancial**. Este concepto **no constituye en sí la evaluación de inocuidad, aunque es un elemento clave de referencia, y una conclusión posible a la que lleva el análisis comparativo**. Este enfoque no hace otra cosa que tomar como referencia los cultivos o alimentos conocidos y aceptados como seguros y compararlos con sus versiones mejoradas mediante ingeniería genética.

Es oportuno aclarar que estas técnicas no en todos los casos van a tener como resultado la expresión de un transgén, sino que hay otras estrategias experimentales - silenciamiento mediado por RNA de interferencia o anulación de la actividad de un gen por "knock out" - que si bien involucran manipulación in vitro y transformación, no resultan en la adición de un gen y/o una proteína nuevos.

**La base de esta estrategia para establecer inocuidad de nuevos alimentos es la historia de uso seguro del cultivo parental (es decir aquel que es la base de la modificación) .**

### **-Qué se compara y por qué**

Es claro que toda modificación tiene un objetivo, ya sea obtener una mejora de tipo agronómica como resistencia a plagas o enfermedades, una mejora nutricional o de calidad o bien la síntesis de un producto en particular, desde un fármaco hasta biocombustibles, pasando por vacunas comestibles. Es decir, que la modificación tiene efectos **intencionales** medibles, que se traducen en una **característica fenotípica dada**.

Por otro lado, es posible que se produzcan efectos **no intencionales** de la modificación, que pueden o no tener un impacto negativo en la seguridad de la planta modificada, pero que es pertinente estimar. Y es aquí donde el análisis comparativo tiene un papel relevante.

Los impactos no deseados de la introducción de un gen o secuencia en el genoma de una planta, comprenden diferentes aspectos que son examinados durante el proceso de evaluación:

- Toxicidad o alergenicidad de la(s) proteínas expresadas
- Influencia de los productos de expresión sobre el metabolismo de la planta, que lleve a cambios en el valor nutricional o la concentración de tóxicos o alérgenos naturales.
- Inserción no intencional en otros genes ("knock out" no intencional) que sean esenciales o activación de otros, que no se expresen normalmente.
- Efectos pleiotrópicos de los genes insertados (efectos sobre la actividad de otros

genes o vías metabólicas, que se manifiestan a diferentes niveles en el fenotipo de la planta).

Es importante tener en cuenta que estos efectos también pueden producirse durante el mejoramiento convencional (definido como el que no utiliza ingeniería genética), si bien los cultivos mejorados mediante tecnologías no recombinantes no se someten por el momento, a este tipo de evaluación, con la excepción de Canadá, que sí regula algunos casos especiales. La normativa canadiense, evalúa aquellas variedades con rasgos suficientemente novedosos, independientemente del proceso utilizado para su obtención, si bien menciona particularmente ciertas metodologías de mejoramiento, como la mutagénesis acelerada (inducida por agentes químicos o irradiación) o la fusión celular.

Como veremos en detalle a continuación, **el proceso evaluativo recorre una serie de pasos que se basan en evidencia experimental**, y que van llevando a conclusiones que permiten tomar decisiones respecto de la inocuidad del OGM en cuestión (Ver Figura 3).

Las evaluaciones de seguridad, entonces, se concentran:

- 1. en la característica introducida:** para ello, se caracteriza completamente el gen insertado en el cultivo GM y se evalúa la seguridad de la/s proteína/s resultantes. Si bien esta evaluación la deben realizar los obtentores previamente a la transformación, ya que no será aprobado un cultivo que pueda presentar algún problema toxicológico o de alergenicidad, las agencias regulatorias encargadas del control de estos productos efectúan un exhaustivo análisis de seguridad de los genes insertados y sus productos de expresión.
- 2. en el cultivo o alimento como un todo:** sobre el cultivo GM, se analizan los rasgos fenotípicos / agronómicos y la composición y se los compara con los de sus contrapartes no-GM o convencionales. Las diferencias encontradas, ya sean intencionales o no, se convierten en el centro de ulteriores evaluaciones de seguridad. El objetivo de estas evaluacio-

nes es demostrar que el cultivo o alimento GM es "**tan seguro como**" el alimento tradicional conocido (Figura 2).

La evaluación de inocuidad de las proteínas de nueva expresión, así como del alimento completo, se fundamenta en lo que se denomina el "**Peso de la Evidencia**". Este concepto se basa en el hecho de que no existe un solo estudio o ensayo que pueda establecer la inocuidad. Por ejemplo, en el caso del potencial alergénico de una proteína, no es posible hoy contar con modelos que predigan adecuadamente la alergenicidad en humanos. Dado que existe una serie de parámetros fisicoquímicos que son compartidos por los alérgenos proteicos conocidos (que son un grupo reducido de proteínas de origen animal y vegetal), éstos pueden ser utilizados para estimar la posible alergenicidad de la proteína introducida. Por ejemplo, **la resistencia a la digestión, la prevalencia en el alimento** (normalmente, los alérgenos proteicos son mayoritarios en la composición final) **y la similitud con otras proteínas alergénicas**, son algunos de estos parámetros. En efecto, se realizan **análisis bioinformáticos** que comparan la secuencia de los productos de expresión presentes en los OGMs, contra bases de datos de todos los alérgenos conocidos.

En el caso de cultivos con actividad alergénica conocida (como la soja) es posible comparar los patrones de proteínas del suero de pacientes sensibles, que se unen a inmuglobulina E (la responsable de las reacciones alérgicas severas) en análisis de Western sobre geles bidimensionales, para determinar si hay nuevas proteínas o si el patrón endógeno se ha visto alterado por la modificación.

Como ya se dijo, aún no se cuenta con modelos animales que se encuentren lo suficientemente desarrollados para ser validados a nivel internacional en cuanto a su capacidad predictiva de alergenicidad, pero numerosos organismos e instituciones internacionales se encuentran trabajando en ello.

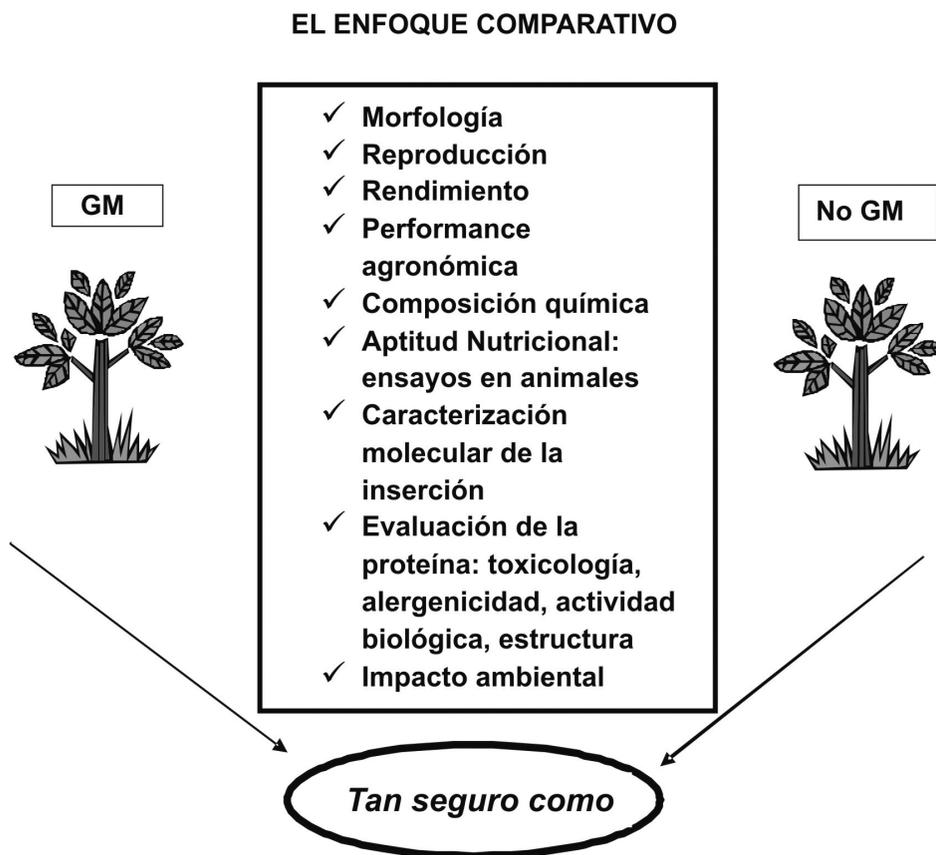
**b)** En base a los 50 años de experiencia ganada en mejoramiento tradicional (breeding), y evaluación de seguridad de otros productos como medicamentos, alimentos, y químicos,

las agencias internacionales recomiendan comparar los siguientes parámetros de los OGMs respecto de contrapartes convencionales, para poder contar con suficiente información que permita arribar a una **certeza razonable de inocuidad** :

**-Parámetros fenotípicos:** estos son más relevantes para la evaluación agronómica del nuevo cultivo. La caracterización fenotípica / agronómica del cultivo GM se hace tempranamente durante el proceso de selección. Los puntos evaluados ( por ej. morfología, rendimiento) son muy sensibles a los cambios genéticos y a las perturbaciones desfavorables en el metabolismo, por lo tanto son buenos indicadores de equivalencias entre el cultivo modificado y su contraparte tradicional.

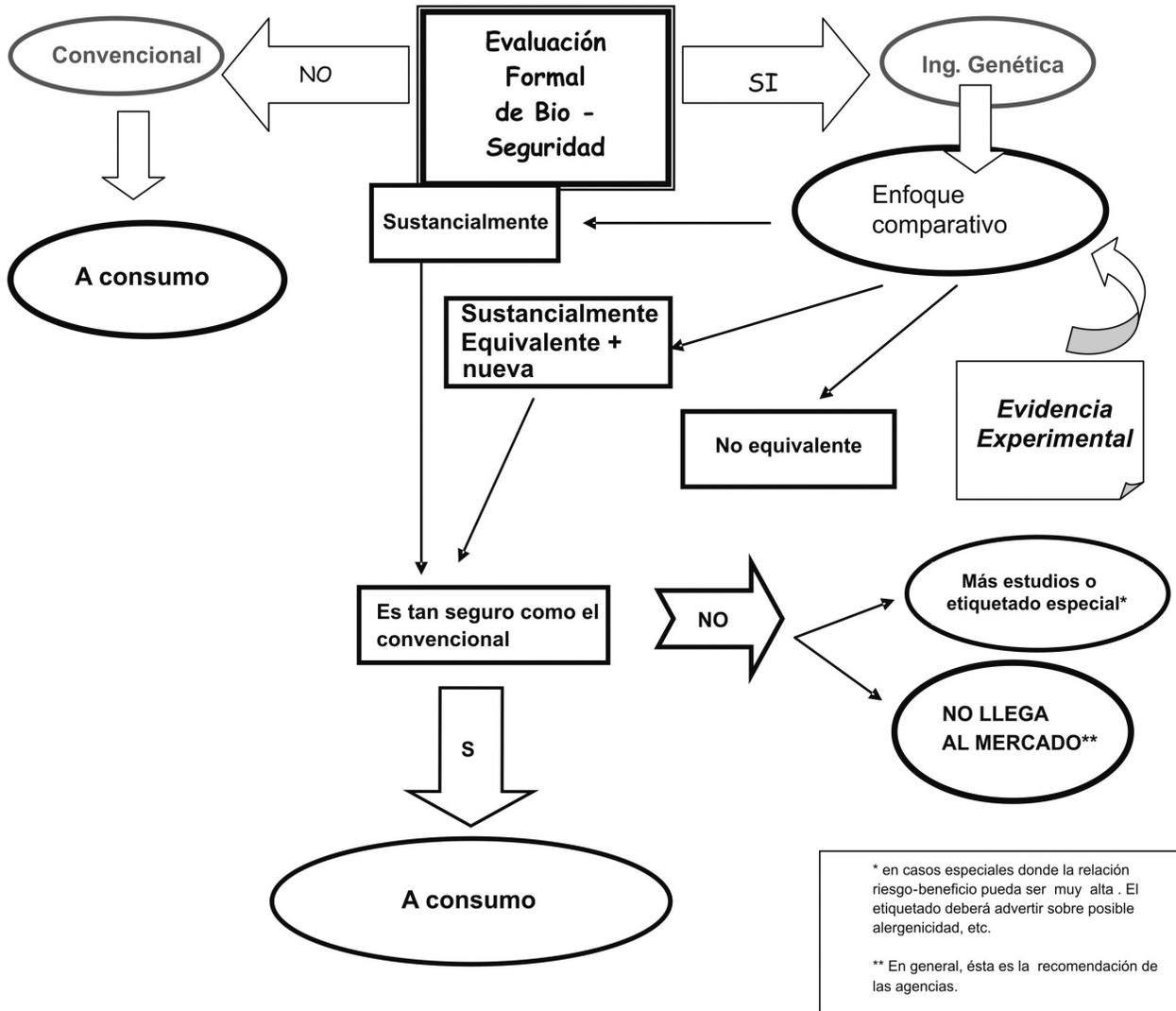
Se observan y miden cuidadosamente las características morfológicas, fisiológicas, y reproductivas, la resistencia o susceptibilidad a plagas y enfermedades, e incluso características como perfume o sabor de los frutos. Este proceso, que dirige la selección de aquellas plantas transformadas (o “eventos”) que tengan las características deseadas, es crítico para eliminar efectos no intencionales.

**-Composición Química:** esta es la evaluación en la que se fundamenta gran parte del análisis comparativo. Se realiza la determinación analítica de la composición en diferentes tejidos de la planta, sobre muestras de ensayos a campo controlados, realizados en ambientes representativos de aquellos donde ese cultivo va a ser sembrado, a lo largo de varias



**Figura 2.** Esquema general del enfoque comparativo

# Nuevo Alimento o Variedad



**Figura 3.** Diagrama para la estimación de seguridad de OGMs  
Adaptado de Cockburn , 2002

campañas de producción (años). Se determina la composición de **macro y micronutrientes** (proteínas, grasas, hidratos de carbono, aminoácidos y ácidos grasos, vitaminas, etc), **minerales, tóxicos naturales y compuestos bioactivos y/o metabolitos secundarios**, dependiendo del cultivo. Por ejemplo, se miden niveles de fitoestrógenos y antinutrientes (inhibidores de tripsina, lectinas) en soja, glucosinolatos en colza, cumarinas en apio y solaninas en papa. También se pueden medir alérgenos en soja (glicinina), beta carotenos en zapallo, y gopipol en algodón. La OECD ha publicado recientemente recomendaciones que especifican qué componentes es más apropiado analizar para cada cultivo en particular.

**A parte de la comparación en componentes específicos, se realizan generalmente, ensayos de aptitud nutricional en modelos animales.** Estos, apuntan a detectar cualquier efecto no intencional de la modificación que pudiera haber afectado el **valor nutricional** del alimento o su inocuidad. Es común que se utilicen ensayos de alimentación de duración variable (entre 42 y 120 días) dependiendo del modelo elegido. Uno de los más utilizados y sensibles, es el de pollos parrilleros, ya que pasan de pesar 35 gramos a más de 2 kg en 42 días. Este crecimiento rápido, hace que se puedan detectar pequeñas deficiencias nutricionales del alimento.

**Mientras que la evaluación de seguridad de las proteínas introducidas se lleva a cabo con la proteína (s) purificadas y generalmente sintetizadas en modelos bacterianos (por la cantidad que se necesita para los ensayos toxicológicos), los estudios de alimentación se realizan con el alimento completo**, por ejemplo, grano o forraje en el caso de maíz, harinas de soja tostadas, o semilla de algodón como suplementación de la dieta. (Ver Tabla 2).

Según los resultados de todos los puntos analizados, es posible clasificar al cultivo o alimento GM en una de estas tres categorías posibles (FAO/OMS/OECD):

- El producto GM es **sustancialmente equivalente** a la contraparte tradicional, no existiendo diferencias significativas. Esta situación se da principalmente en

productos altamente refinados. El aceite o la fructosa derivados de maíz GM, son totalmente equivalentes a los derivados de maíz convencional.

- El cultivo o alimento GM es **sustancialmente equivalente** a su contraparte tradicional **con la excepción de diferencias claramente definidas** (presencia de la/s proteínas introducidas y/o diferencias bien caracterizadas en otros elementos individuales). **Dentro de esta categoría caen la mayoría de los cultivos que expresan un rasgo único, tal como la resistencia a herbicidas o la protección contra insectos, y algunos con mejoras nutricionales o de calidad.** Para demostrar que los cultivos o alimentos GM son "tan seguros como" su contraparte tradicional, se debe mostrar que cada diferencia encontrada no tiene consecuencias toxicológicas ni nutricionales. Esta evaluación se lleva a cabo **caso por caso**, y según se considere necesario, pueden conducirse ensayos de toxicidad o estudios de alimentación en animales grandes con el cultivo entero.
- El cultivo o alimento GM **no es sustancialmente equivalente** a su contraparte tradicional o no existe un cultivo equivalente con el cual compararlo. Ejemplo de esto serían **cultivos con ciertos rasgos combinados o cultivos con valor nutritivo aumentado que contienen nuevas vías metabólicas o modifican las endógenas.** La evaluación de seguridad se va a enfocar en las características de los nuevos productos expresados. En cada caso en particular se determinará el programa de estudios que corresponda.

Actualmente, todos los cultivos modificados y sus productos alimentarios derivados presentes en el mercado han sido analizados en profundidad para evaluar su seguridad, demostrándose que son sustancialmente equivalentes, con la excepción de la/s proteínas introducidas y son tan seguros como su contraparte tradicional.

En la Tabla 1, se resume como ejemplo, el tipo de componentes analizados en diferentes

**Tabla 1.** componentes analizados en semillas enteras de soja y en varias fracciones de soja procesada (Tomado del Cuadernillo Técnico No1, Seguridad de la Soja RR tolerante a Glifosato (Monsanto Agricultura España, 2001)

<b>Soja entera</b>	Análisis de macronutrientes Composición de aminoácidos Composición de ácidos grasos Inhibidor de tripsina Lectinas Fitoestrógenos Actividad ureasa Composición fosfolipídica
<b>Harina tostada</b>	Análisis de macronutrientes Inhibidor de tripsina Lectinas Fitoestrógenos Actividad ureasa Estaquiosa, rafinosa Fitato Solubilidad del nitrógeno
<b>Harina desgrasada</b>	Análisis de macronutrientes Inhibidor de tripsina Actividad ureasa
<b>Aislado de proteínas</b>	Análisis de macronutrientes
<b>Concentrado de proteínas</b>	Análisis de macronutrientes
<b>Aceite refinado, blanqueado y desodorizado</b>	Composición de ácidos grasos

fracciones, para la evaluación de seguridad alimentaria para el evento de soja GM 40-3-2, tolerante a glifosato (ver Parte VIII, capítulo 6). En la Tabla 2 se listan los diferentes modelos animales utilizados para la evaluación de aptitud nutricional de OGMs y los parámetros que se analizan en cada caso.

a: los cultivos GM estudiados presentan tolerancia a insectos (“Bt”) o a herbicidas (glifosato, glufosinato)

b: en la mayor parte de los ensayos también se efectuaron análisis de detección del ADN o de las proteínas introducidas, en leche, huevos, músculos, hígado, sangre o heces, con resultados negativos en todos ellos.

### 3. Evaluación de Impacto Ambiental

La evaluación del impacto ambiental de nuevos cultivos GM es una parte fundamental de

su proceso de aprobación y control. Esta evaluación debe basarse en hipótesis de riesgo, y considerar el contexto de las tecnologías que se utilizan con el mismo fin y de tecnologías alternativas, en caso de existir.

En los Capítulos 2 y 3 de esta sección, se desarrolla este aspecto en mayor detalle, por lo que se enunciarán los principales temas en los que se enfoca la evaluación que se realiza antes de la introducción de un OGM en los agroecosistemas:

**Capacidad de convertirse en maleza:** en caso de que la planta GM tuviera características que la hicieran más resistente a las condiciones ambientales, o tuviera mayor poder reproductivo que su contraparte convencional.

**Posible impacto en especies benéficas** o sobre la flora o fauna circundante: es evaluado

**Tabla 2.** Ensayos de alimentación con OGMs en modelos animales (adaptado de Kuiper et al, 2001, Faust and Glenn, 2002)

Cultivo GM <sup>a</sup> / fracción	Modelo Animal	Parámetros analizados <sup>b</sup>
Maiz/grano Soja/alimento tostado.	Pollos parrilleros Gallinas ponedoras	Ganancia de peso, observaciones clínicas, ingesta, calidad de carne, producción y calidad de huevos, digestibilidad
Maíz/ silaje/ forraje/ grano Soja/alimento tostado. Soja cruda	Vacas (ganado de carne)	Ganancia de peso, ingesta, observaciones clínicas, producción y calidad de carne, grasa abdominal.
Maiz/grano Soja/alimento tostado.	Cerdos	Ganancia de peso, ingesta, observaciones clínicas, calidad de carne, contenido grasa.
Algodón/ semilla Maiz/grano Soja/alimento tostado.	Vacas lecheras	Ganancia de peso, ingesta, observaciones clínicas, pH ruminal, producción, calidad y composición de la leche, características para producción de queso.
Maiz/grano	Ovejas	Digestibilidad

el impacto que el cultivo podría tener en especies propias del agroecosistema. Por ejemplo, efectos sobre especies que no son el blanco de su actividad en el caso de cultivos GM protegidos de insectos .

**Mayor capacidad de cruzarse** con plantas de su entorno que la contraparte convencional. Incluso en caso de ser idéntica, se evalúa cuáles serían las consecuencias de dichos cruzamientos (debido al llamado **flujo génico mediado por polen**).

El flujo genético entre poblaciones es un fenómeno natural, responsable de una gran diversidad genética. **Para estimar qué peso puede tener un rasgo nuevo introducido por ingeniería genética en el flujo génico general, es importante tener en cuenta qué efecto en particular producirá ese gen si se establece en otra población.** Todo esto se examina en función de la existencia de parientes silvestres de ese cultivo en la zona donde se lo quiere introducir. Por ejemplo, en el caso de la soja o el maíz, no existen parientes silvestres en Argentina, pero sí en México (en el caso de maíz) y en China (en el caso de la soja).

Todos estos puntos son analizados, del mismo modo que la inocuidad alimentaria, **caso por caso**. También se estima el cambio que podría provocar en el manejo agronómico, la introducción de un dado cultivo GM .

El objetivo de las evaluaciones de riesgo ambiental, es identificar impactos en el ambiente (negativos o positivos), cuantificarlos y proporcionar elementos para aquellos que deben manejar y minimizar estos riesgos, siempre en el contexto de la práctica agronómica corriente y de las tecnologías alternativas disponibles (por ejemplo, cultivos “Bt”, evaluados en relación con las aplicaciones tradicionales de insecticidas químicos, y en el contexto del Manejo Integrado de Plagas, como una herramienta más de control biológico).

#### **4. Nuevas tecnologías potencialmente aplicables a la evaluación de la bioseguridad**

Los avances en la tecnología científica de los últimos años han transformado profundamente la forma en la que se hace ciencia y se obtiene información de los sistemas biológicos. La

enorme capacidad de secuenciación en combinación con la bioinformática, han potenciado la identificación y caracterización de genes (Genómica) y el estudio de su función (Genómica Funcional).

Otras tecnologías derivadas de las primeras y en constante evolución, se ocupan del estudio del **Transcriptoma**, el **Proteoma**, el **Metaboloma**, que abarcan todos los transcritos, proteínas o metabolitos de una especie, respectivamente. Hoy se habla de las **tecnologías “ómicas”** en referencia global a este tipo de aproximación.

Paralelamente, estas tecnologías permiten el desarrollo de nuevos campos de la ciencia, como la Farmacogenómica, la Toxicogenómica y la Nutrigenómica, que son versiones “ómicas” de las especialidades tradicionales que abordan el mismo problema.

Estas tecnologías hoy se encuentran en una etapa inicial de generación de enormes cantidades de datos; sin embargo, el potencial que presentan a corto y mediano plazo para el descubrimiento y la comprensión de procesos biológicos, no tiene precedentes.

Sin embargo, en el campo del análisis de riesgo, especialmente en los aspectos toxicológico y nutricional, aunque sería valioso contar con tecnologías que permitan determinar los **perfiles bioquímicos de OGMs y sus contrapartes convencionales (profiling)**, por el momento no es posible establecer metodologías validadas que permitan aplicar esta información al análisis. El problema es que, al penetrar en niveles de resolución tan altos, se encuentran una serie de cambios que incluso son evidentes entre individuos del mismo grupo (por ejemplo, individuos de la misma variedad no GM) en niveles mayores a los que se encuentran entre un OVG y su control, debido a la variabilidad natural. Esta variabilidad, hace muy difícil poder interpretar de manera clara muchos de los resultados que se obtienen, y su significación biológica real, para poder sacar conclusiones en cuanto a su relevancia en la bioseguridad.

**Sin embargo, a medida que se avanza en el conocimiento de los sistemas biológicos, será posible aplicar nuevas tecnologías a la evaluación de la seguridad alimentaria, no sólo de OGMs, sino de cualquier alimento.**

## Conclusión

**El objetivo del análisis de riesgos para organismos y/o alimentos derivados del uso de la ingeniería genética (GM), es estimar el impacto que los efectos intencionales y los no intencionales de la modificación, pudieran tener sobre la inocuidad del alimento o del organismo GM, o sobre su impacto ambiental.**

**El enfoque utilizado para aplicar este proceso (el enfoque comparativo), ha sido consensuado a partir de consultas y discusiones a nivel internacional, y se basa en la comparación de parámetros como composición, tóxicos naturales o aptitud nutricional, con la contraparte convencional que tiene historia de uso seguro y es aceptado como alimento inocuo (OECD, 2000).**

## Lecturas y sitios sugeridos:

- Batista JC, Burachik M y Rubinstein C. 2007. Evaluación de inocuidad alimentaria de OGMs: Criterios y Recursos para su implementación. United Nations University - ILSI. [http://www.ilsil.org.ar/contactos/docs\\_biotechnologia/Evaluacion\\_de\\_inocuidad.pdf](http://www.ilsil.org.ar/contactos/docs_biotechnologia/Evaluacion_de_inocuidad.pdf)
- Burks AW, Fuchs RL (1995) Assessment of the endogenous allergens in glyphosate tolerant and commercial soybean varieties. *J Allergy Clin Immunol* 96:1008-1010
- Carpenter J, Felsot A, Goode T., Hammig M, Onstad D, Sankula S. (2002). Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops. Council for Agricultural Science and Technology CAST: I-189.
- Cockburn, Andrew (2002). Assuring the safety of Genetically Modified Foods: the importance of an holistic, integrative approach. *Journal of Biotechnology*, 98, 79-106.
- FAO/WHO (2000) Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. World Health Organization, Geneva WHO/SDE/PHE/FOS/00.6
- Faust, M y Glenn, B. (2002) Animal feeds from Crops Derived through Biotechnology: Farm Animal Performance and Safety. En: *Biotechnology and Safety Assessment*, 3ra edición, John Thomas y Roy Fuchs, Elsevier. Capítulo 6.
- Glare A, Travis R., Nap JP. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk

- assessment. *The Plant Journal* 33: 19-36.
- ILSI Allergy and Immunology Institute and International Food Biotechnology Council (1996) Allergenicity of food produced by genetic modification. *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol 36 suppl, CRC Press, Boca Raton .
- ILSI : International Food Biotechnology Committee (IFBiC), 2003 : base de datos composicional de cultivos agroalimentarios : [www.cropcomposition.com](http://www.cropcomposition.com)
- Pimentel DS, Raven PH (2000) Bt Corn Pollen impacts on nontarget Lepidoptera: Assessment of Effects in Nature. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 97:8198-8199 <http://www.pnas.org/cgi/reprint/97/15/8198.pdf>
- Taylor NB, Fuchs RL, MacDonald J et al. (1999) Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. *J Agric Food Chem* 47:4469-4473
- WHO (1995) Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology. Report of a WHO workshop. World Health Organization, Geneva.
- WHO/FNU/FOS/95 Wolt J, Keese P, Raybould A, Fitzpatrick J, Burachik M, Gray A, Olin S, Schiemann J, Sears M and Wu F , 2009. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants Transgenic Res DOI 10.1007/s11248-009-9321-9
- OECD: [http://www.oecd.org/subject/biotech/report\\_taskforce.pdf](http://www.oecd.org/subject/biotech/report_taskforce.pdf)
- Codex: [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org) Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca: [www.minagro.gob.ar](http://www.minagro.gob.ar) (ir a SENASA, Resol. 412).



## PARTE VI. CAPITULO 2

### Bioseguridad

Moisés Burachik

### Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados - Marcos Regulatorios

#### Panorama Internacional

Desde 1986, algunos países como Japón, por ejemplo, se han ocupado de elaborar y desarrollar regulaciones para controlar la entrada en el mercado de productos derivados del uso de técnicas de ADN recombinante. En ese momento el foco estaba puesto en los **ingredientes o aditivos alimentarios producidos por microorganismos recombinantes**, pero a medida que la tecnología avanzaba y se aplicaba a otros organismos, estas reglamentaciones se vieron extendidas a plantas y animales modificados.

Numerosos países en los cinco continentes, tienen en este momento un **marco regulatorio** disponible para la evaluación y aprobación de OGMs antes de su entrada en el mercado.

Entre los primeros países que han desarrollado estos procesos, se encuentran los países europeos, siendo la Comisión Europea, el órgano de evaluación y control de la Unión Europea. En los Estados Unidos, diferentes agencias están involucradas en estas evaluaciones: la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) y el Departamento de Agricultura (USDA). Canadá y Australia-Nueva Zelanda, han establecido sus sistemas regulatorios más recientemente (a partir de 1993).

En cuanto a América Latina, Argentina fue el país pionero en esta materia, con la creación de **CONABIA** en 1991, en el ámbito de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Otros países de la región han comenzado desde entonces a

establecer sistemas para la evaluación de la bioseguridad de OGMs. Colombia, Chile, Brasil, Uruguay, Paraguay y Perú, por ejemplo, poseen comisiones técnicas evaluadoras, y en algunos de estos países ya se han aprobado la comercialización y el cultivo de variedades GM. Estos sistemas están siendo establecidos en muchos otros países, especialmente apuntando a la implementación del **Protocolo de Bioseguridad**, también conocido como Protocolo de Cartagena, vigente desde Septiembre de 2003. Este protocolo, firmado en el año 2000 por más de 130 estados, regulará los **movimientos transfronterizos de OGMs vivos** o OVGMs, con el objeto de asegurar un nivel adecuado de bioseguridad en el comercio internacional y la conservación de la biodiversidad. Para una actualización sobre marcos regulatorios en América Latina, ver el listado de sitios recomendados.

#### Cuáles son los riesgos?

Uno de los problemas inherentes a la concepción de un marco regulatorio para los ensayos de campo de plantas GM es el de la identificación de los riesgos que deben considerarse. Esta identificación depende de las opciones que se acepten de un conjunto de posibilidades y de los **valores** a proteger. Estos valores deben ser establecidos por cada país, con el aporte de la Sociedad (científicos, funcionarios, políticos, empresarios, público en general). Esto es, deben **compatibilizarse criterios sobre lo que se consideran riesgos aceptables**, en un marco de intereses muy variados.

Por otra parte, si bien la identificación de los riesgos se basará en conocimiento científico disponible ahora, existirá siempre un componente de **extrapolación** (si bien plausible) cuando se estimen efectos adversos "potenciales", que es la materia misma y el objetivo del **análisis de riesgos**.

No obstante estas limitaciones, la evaluación de efectos potenciales de una entidad y sus implicaciones, para verificar y estimar la posibilidad de ocurrencia de un efecto adverso y caracterizar la naturaleza de tal efecto, es definible como una actividad científica,

como la ha declarado la Academia de Ciencias de los EEUU.

### **La Formulación del Problema**

En la actualidad, se discute la aplicación de la denominada Formulación del Problema, a la evaluación de seguridad ambiental de OGMs. Este proceso, es el primer paso en la ERA (Evaluación de Riesgo Ambiental) y permite establecer un Marco Conceptual, en el que se consideran los objetivos, el alcance, los objetivos de estudio y las metodologías a aplicar, para llegar a plantear un problema explícitamente definido y la aproximación para su análisis.

La consistencia y la utilidad de la ERA para plantas GM puede ser mejorada mediante una rigurosa formulación del problema, produciendo un **plan de análisis** que describa escenarios de exposición relevantes y las consecuencias potenciales de estos escenarios. Una formulación del problema ejecutada adecuadamente, asegura que los resultados del ERA sean relevantes para la toma de decisiones.

Entre las características comúnmente consideradas cuando se plantean los potenciales riesgos de las liberaciones de plantas GM, se pueden mencionar los siguientes (muchos de estos puntos son también aplicables a nuevas variedades o híbridos desarrollados convencionalmente):

#### **I Pérdida de Diversidad Biológica:**

Aquí nos referimos a la pérdida debida a la presión del mercado y de los costos sobre los productores, induciendo cambios en las prácticas agronómicas (menor uso de herbicidas e insecticidas) por la utilización (ventajosa) de OGMs, en desmedro de razas locales adaptadas (*landraces*) empleadas en la actualidad.

Esto podría producirse si se cultivan OGMs en la vecindad de centros de origen o de diversidad de sus parientes silvestres o de especies sexualmente compatibles, por fenómenos de **introgresión génica** (este riesgo es relativamente más importante en el hemisferio Sur).

**II Transferencia genética a especies silvestres o malezas** sexualmente compatibles, con el resultado de la formación de híbridos viables con fenotipos no deseados (p.ej., to-

lerancia a herbicidas, resistencia a insectos u otras plagas).

**III Incremento de la presión de selección**, tal que favorezca un aumento de la tolerancia de plagas a insumos defensivos actualmente empleados. En el caso de insumos que por razones ambientales, económicas o de manejo agrícola, son apreciados por el productor y/o por la Sociedad (p.ej., herbicidas post-emergentes, productos biodegradables, insecticidas biológicos, productos de menor costo, o sin restricciones relacionadas con la propiedad intelectual, etc.), el aumento de la tolerancia de la plaga al producto es un efecto desfavorable, ya que puede convertir a dicho insumo en inútil en el futuro.

**IV Modificación de las relaciones predador-plaga entre insectos**, en detrimento de los insectos benéficos. Aquí se incluyen los **efectos sobre organismos no-blanco** (caso de cultivos con incorporación de genes de resistencia a insectos). El conocimiento insuficiente sobre especies amenazadas de extinción (p.ej., insectos benéficos, sus plantas-refugios, etc.), también es un factor a tener en cuenta.

**V Posibles cambios en los flujos comerciales.**

### **Fundamentos de las normativas - Definiciones**

La elaboración y evolución de un marco regulatorio para la bioseguridad de una tecnología novedosa como la biotecnología aplicada al mejoramiento vegetal, no está exenta de dificultades.

Por una parte está la **responsabilidad de asegurar la aplicación sustentable de la nueva tecnología**, y de preservar al hombre, la flora, la fauna y el medio ambiente de los potenciales efectos perjudiciales de las innovaciones, tanto en el presente como en el futuro. Por otra parte, hay razones para **no obstaculizar el desarrollo de las innovaciones biotecnológicas**, que ya han demostrado poseer un gran potencial para brindar beneficios a la Sociedad. Toda actividad humana (especialmente la innovación tecnológica) implica peligros (riesgos) y por lo tanto requiere la atención (gestión) de su seguridad.

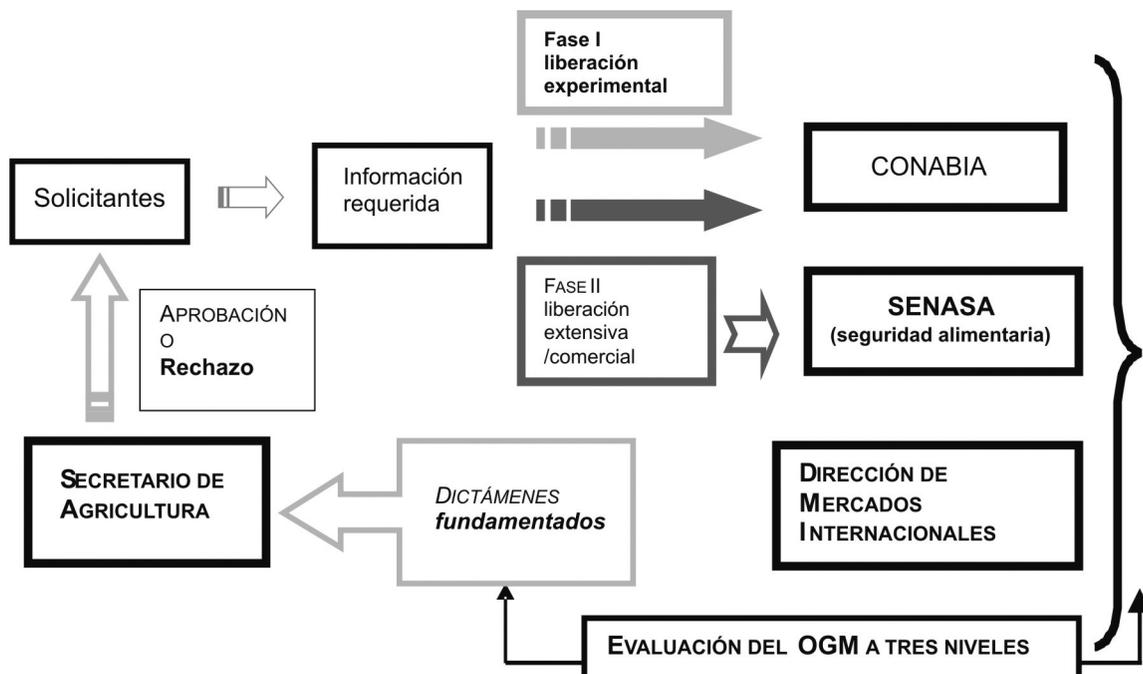


Figura 1. el sistema de regulación y aprobación de OGMs en Argentina

La seguridad se obtiene **definiendo, evaluando y gestionando los riesgos** asociados con la innovación.

Aplicando estos conceptos a la biotecnología, que implica el uso de organismos vivos, podemos enfocar **el análisis de los riesgos de los ensayos** hacia los siguientes aspectos generales:

- **Identificación de los todos organismos involucrados** (donantes, receptores, etc),
- **Características de los organismos involucrados en la obtención del OGM** (familiaridad, patogenicidad, etc)
- **Manera en que serán utilizados los OGMs** (escala, contención)

**Características de las zonas y de los otros organismos** (lugares, medio receptor potencial, incluyendo seres humanos)

La normativa argentina ha tomado en consideración estos aspectos, entre otros, para elaborar un marco regulatorio detallado para los **Ensayos a Campo de Plantas Transgénicas**, que se describe a continuación en sus rasgos principales.

Consideramos una definición aceptable de **bioseguridad**, como la **protección de la salud humana y del ambiente con respecto a los riesgos conocidos y/o percibidos de la técnica o proyecto en cuestión, de acuerdo al estado actual de nuestros conocimientos**. Está implícita en esta definición que una regulación para la bioseguridad, que significa *una regulación de los riesgos aceptables para la Sociedad*, conlleva una condición de flexibilidad y de adaptación permanentes.

Para la normativa argentina, un **OGM** es:

- un organismo (vegetal, animal, microorganismo o virus)
- en el cual se ha introducido información genética precisa y definida
- en forma deliberada y dirigida a obtener un determinado fenotipo
- siendo aquella introducción realizada de tal manera que dicha información genética no podría haber sido adquirida por ese organismo por la vía de mutaciones, recombinaciones u otras formas de transferencia genética reconocidas como mecanismos que operan en la Naturaleza sin intervención humana.

Esta definición hace referencia al **método de obtención del OGM**, con el propósito de establecer el campo de aplicación de la norma, excluyendo, por ejemplo, los cruzamientos tradicionales. Sin embargo, en el **análisis del riesgo** de la liberación de un OGM, la característica dominante, esto es, aquella que constituye el foco del análisis de la Comisión, es el **inserto**, esto es, **la porción de DNA efectivamente presente en el genoma transformado**, cuya naturaleza y consecuencias (geno- y fenotípicas) caracterizan al OGM como tal.

**Al OGM o conjunto de OGMs con un dado inserto se los denomina colectivamente evento.** Varios OGMs pueden contener el mismo evento, y por lo tanto sus análisis de riesgo serán equivalentes. Ocasionalmente, en etapas tempranas del desarrollo de un OGM, se admite que el evento puede no estar inequívocamente caracterizado, en el sentido de que no se ha definido el inserto con la debida precisión (por ejemplo, el inserto puede estar en diferentes posiciones en el genoma del vegetal). En estos casos, el análisis se enfoca en la **construcción genética** utilizada en la **transformación**.

Definimos como transformación, el método utilizado para introducir la nueva información genética, vehiculizada por el vector.

Si bien la normativa argentina atiende aspectos del proceso de obtención de un OGM en el análisis de riesgo, esa atención **sólo se enfoca en aquellas características que interesan en la evaluación del producto** (y no del proceso de su obtención), en el sentido de que esas características se encontrarán finalmente en el OGM obtenido.

Otra característica del marco regulatorio administrado por la CONABIA es que considera cada producto o liberación **caso por caso**. Si bien los antecedentes (si los hubiera) se tienen en cuenta, y los casos similares son identificados y considerados como objetos de información válida para la evaluación, **los datos no son transferibles**, y cada caso y/o solicitante deben ser coherentes y autosuficientes en cuanto a la información que provee a la Comisión. La definición de **caso** es entonces relevante. Un caso está definido por:

- **La empresa o ente solicitante.**
- El **evento de transformación** (es decir:

**un inserto definido** introducido en el genoma de la planta, admitiéndose un conjunto de eventos con un único vector en las etapas muy preliminares del desarrollo del OGM).

- **La escala de la liberación.**

Cualquiera de estas condiciones que no se conserve (p.ej., el mismo evento presentado por dos empresas o entes diferentes) representará un caso diferente.

La normativa puesta en práctica es **proactiva**, en el sentido de que requiere un análisis previo de todas las previsibles consecuencias de una liberación **antes** de que tal liberación sea autorizada.

Como mencionamos antes, Argentina dispone desde 1991 de un marco regulatorio para el Análisis y la Gestión de los Riesgos asociados con los Ensayos a Campo de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs). Esta normativa es administrada por la **Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria** (CONABIA), que opera en el ámbito del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Esta Comisión es **multisectorial** (la forman representantes de los sectores público y privado), **multidisciplinaria**, y es la encargada de emitir las **recomendaciones con respecto a la autorización** para los ensayos solicitados (experimentación y/o liberaciones a campo). Estas recomendaciones son remitidas a la autoridad decisoria.

La consideración básica que guía el funcionamiento y los dictámenes de la CONABIA es la **Bioseguridad**, y su característica esencial es que funda sus procedimientos operativos en **consideraciones exclusivamente técnicas, fundadas en los conocimientos científicos disponibles**.

Los principales criterios aplicados en la normativa argentina son:

- **el criterio de bioseguridad:** la definición, evaluación y gestión de los riesgos, es la consideración primaria y su aplicación es **proactiva**, esto es, debe realizarse **antes de autorizarse la liberación**; los ensayos son evaluados **caso por caso**; el foco del interés está **en el producto**, pero aquellas características

del procedimiento de su obtención que terminan afectando o manifestándose en el producto final, son también analizadas

- **el enfoque precautorio:** el marco regulatorio **acompaña el desarrollo** del producto, y no se requiere la fundamentación científica **completa** para detener dicho desarrollo; basta que se presente alguna de las siguientes situaciones: i) no existe suficiente información sobre el sistema, ii) los riesgos no son aceptables en base a presunciones razonables, iii) la evaluación no sea concluyente, o iv) el sistema es demasiado complejo

La CONABIA no interviene en las etapas ulteriores (aprobación alimentaria, dictamen sobre el impacto en las exportaciones y registro, para la comercialización) del camino de una planta GM hacia el mercado (Ver Figura 1). Sin embargo, emite un **dictamen particular fundado** sobre la bioseguridad de la producción masiva a escala comercial del cultivo en cuestión. De este modo, la CONABIA dictamina sobre la historia de bioseguridad de la planta transgénica, para información de las agencias específicas del Estado encargadas de aquellos pasos.

En los documentos que presentan a la CONABIA, los solicitantes de autorizaciones de ensayos tienen la opción de hacer reserva de información que consideren confidencial. La información así considerada, será examinada por solamente uno de los miembros de la Comisión, quien deberá emitir un juicio fundado sobre la bioseguridad de la propuesta y exponer esta opinión (aunque no la información reservada) ante la Comisión.

Esta operatoria de CONABIA permite asegurar, tanto para la Sociedad como para los sectores empresariales, un balance correcto entre la protección de la salud, la preservación de la calidad ambiental y la sustentabilidad de los proyectos aprobados, con la implementación regulada, en tiempo y forma, de las innovaciones tecnológicas propuestas por los solicitantes.

La CONABIA realiza las evaluaciones de todas las Solicitudes de liberaciones de OVGM al ambiente, y recomienda al Ministro de Agricultura sobre la conveniencia o no de autorizar dichas liberaciones. Estas evaluaciones comprenden dos fases:

1. las evaluaciones de las **liberaciones experimentales** cuyo propósito es determinar que *la probabilidad de efectos sobre el ambiente es no significativa –primera fase de evaluación-*, y
2. las evaluaciones de las **liberaciones extensivas** cuyo propósito es determinar que dichas liberaciones del OVGM *no generarán un impacto sobre el ambiente que difiera significativamente del que produciría el organismo homólogo no GM –segunda fase de evaluación-*. (Ver Figura 1)

### **Primera Fase de Evaluación: Ensayos experimentales**

Los solicitantes deben presentar un **legajo de información específica**, que consta de una

**Información General** sobre la liberación y sobre el OGM en cuestión y de un apartado sobre las **Condiciones de Bioseguridad** que se pondrán en práctica.

El campo del **análisis de los riesgos** abarcado por estas informaciones, que debe proveer el solicitante, es amplio, e incluye tanto las **características de la liberación como las del OGM**. Con respecto a las características de la liberación, la **Información General** sometida al análisis incluirá:

- Si el material es importado: status regulatorio en el país de origen.
- Propósito de la liberación (objetivo, cronograma, protocolos, antecedentes). Si es a escala de invernadero o a campo
- Operaciones de transporte de OGM (ingreso al país, transportes internos).
- Cantidad y tipo de material a liberar, antecedentes en otros países.
- Lugar de la liberación.
- Detalles operativos para auditar la liberación (fechas, instituciones, personas).

Con respecto a **las características del OVGM**, se analizará el **genotipo** del evento (es decir, **las nuevas características genéticas introducidas**), para lo cual el solicitante debe proveer información con respecto a:

- Descripción de la biología molecular del sistema donante-vector-receptor

- Método de transformación utilizado
- Genes principales (y sus organismos donantes). Genes auxiliares (marcadores de selección).
- Secuencias regulatorias (promotores, terminadores, enhancers, etc.). Otros elementos genéticos introducidos.
- Productos de expresión, tejidos de la planta en los que se expresan, niveles de expresión. Homologías de secuencia con proteínas tóxicas o alergénicas.
- Descripción fenotípica del organismo receptor, centros de origen o diversidad genética.
- Estabilidad fenotípica y número de generaciones en los que se verificó.

En cuanto a la sección sobre las **Condiciones de Bioseguridad**, la información solicitada depende de la escala de la liberación: desde laboratorio/invernadero hasta pruebas a campo. En el caso de eventos que aún no han obtenido la autorización de comercialización en el país, es decir, **eventos regulados**, que se siembran a gran escala para **producciones de semilla en contra-estación** para el hemisferio Norte, o con otros fines, existe un **protocolo específico que es necesario presentar para obtener la autorización**.

En todos los casos el solicitante debe proveer información relativa a varios aspectos básicos de los **Procedimientos de Bioseguridad**, a saber:

**a) Durante la liberación:** Descripción y ubicación del lugar o instalación donde se realizará la liberación. Localización precisa (mapas detallados): distancia a caminos, lugares transitados, límites del predio bajo control del solicitante. Características constructivas de bioseguridad (laboratorio o invernadero) y normas de acceso. Tamaño y número de parcelas, su diseño, plano de siembra y superficie a sembrar. Medidas de aislamiento

- En ensayos a campo: distancias, tiempos de floración, jaulas, cobertura para evitar la diseminación del polen, por viento o insectos, control de vectores potenciales de polen u otro material con capacidad de propagación, etc.
- En ensayos en laboratorio o invernade-

ro: métodos o estructuras de contención contra el ingreso de vectores potenciales de material genético.

**b) En los movimientos de materiales:** semillas, material vegetal acompañante, así como los lugares, normas e identificación del material que sea almacenado.

**c) En lo relacionado con el destino del material cosechado:** el solicitante deberá informar sobre su utilización, aclarando si será local o si será exportado o destruido, e identificando los lugares de su almacenaje final o transitorio.

**d) En lo relacionado con la disposición final (OGM y materiales remanentes):** En lo relacionado con la **disposición final** del OGM y de los materiales remanentes, se requiere información sobre el tratamiento del suelo post-cosecha, el uso futuro del terreno, los controles posteriores (detección de plantas voluntarias) y su duración.

**e) En el caso de un eventual escape del OGM y/o de cualquier material asociado:** El solicitante debe exponer con claridad los procedimientos que seguirá **en el caso de un eventual escape del OGM** y/o de cualquier material asociado. Normalmente, esto incluye métodos de identificación del OGM, procedimientos para limitar y controlar el escape, así como la obligación de notificar perentoriamente a la autoridad regulatoria.

**f) Técnicas que se usarán para detectar la transferencia de genes desde el OGM al ambiente biótico.**

**g) Usos previstos del terreno con posterioridad a la liberación solicitada.** Control posterior de la parcela, duración de los controles post-cosecha.

Una vez completados los ensayos, es requisito indispensable para poder acceder a nuevas autorizaciones, la entrega de un **Informe de Cierre de la Liberación**, que incluye observaciones relativas al comportamiento agronómico del OGM en cuanto a germinación, crecimiento vegetativo, floración, susceptibilidad a enfermedades y plagas, así como efectos sobre organismos no blanco y características de la cosecha, los tratamientos realizados y la disposición final.

Es importante notar que estas liberaciones son periódicamente inspeccionadas por agentes habilitados por la SAGPyA.

La normativa completa, así como los requerimientos de información detallados en los formularios que deben completarse para obtener una autorización de liberación, se encuentran a disposición para la consulta a través del sitio de CONABIA.

### **Segunda Fase de Evaluación: el camino hacia el mercado**

Como ya se ha enfatizado antes, la incumbencia básica de la CONABIA está limitada a la gestión de los riesgos y la bioseguridad de los ensayos a campo de plantas GM a diferentes escalas.

Los pasos siguientes hacia el mercado, es decir la aprobación de su uso como materia prima alimentaria, la verificación de que su liberación comercial no afectará negativamente nuestro comercio internacional, el registro de la nueva variedad, y la autorización para la producción comercial, son resorte de otras agencias del Estado (Ver Figura 1). Esas dependencias basan su decisión en dos clases de información:

- La información requerida a los solicitantes que es específica a sus necesidades (la aptitud alimentaria, la estructura de nuestro mercado de exportación).
- La información suministrada por la CONABIA sobre el comportamiento del OGM en cuestión a lo largo de los ensayos autorizados que se han realizado.

Esta última información constituye una parte crucial del camino de la planta GM hacia el mercado, y es solicitada y analizada por la CONABIA. En la normativa argentina actual se la denomina **Segunda Fase de Evaluación**. La condición necesaria para dar una respuesta positiva a estas solicitudes en la práctica, es que la CONABIA considere que:

***“no existen riesgos para la salud humana, para el agroecosistema, y para la flora y la fauna asociados, derivados del cultivo no confinado del OGM en consideración.”***

Esta categorización requiere del solicitante la presentación de un breve **Resumen** (ca-

racterísticas del OGM; el evento, breve descripción molecular del inserto; usos del OGM, destacando los que difieran del organismo no transformado; condiciones especiales, si las hubiera, para el cultivo extendido en gran escala) y de una **Solicitud** que se compone de:

A) **Información General**, que se refiere a la información anterior, pero de manera más detallada. Deberá incluir, entre otras informaciones,

- **Caracterización del OVGM**, incluyendo proteínas y/o RNAs que expresa el OGM originados en el inserto y el fenotipo que resulta de esa expresión; las ventajas aportadas por la modificación genética; resultados de los ensayos de campo realizados, en el país y en el extranjero, en lo que respecta a la bioseguridad .
- **Una declaración de equivalencia, diferencia o no equivalencia del OVGM**. El solicitante declarará aquí si el OVGM es equivalente al organismo no GM de la misma especie, excepto por el fenotipo aportado por la modificación genética introducida. La declaración se referirá a todas aquellas características del OVGM que no fue intención modificar en el evento. Se deben citar los trabajos que sostienen esta declaración. La equivalencia se referirá al menos a: a) composición centesimal, procesamiento, productos y subproductos; y b) características y prácticas agronómicas, áreas geográficas, tipos de ambientes, precauciones específicas para el cultivo extensivo, si las hubiera, con relación a efectos ambientales. Asimismo, se declararán aquí las observaciones sobre cualquier diferencia no intencional o no esperada, observada en cualquier aspecto de la expresión fenotípica del OVGM en comparación con el organismo no GM de la misma especie. Se deberá incluir toda observación que haya surgido en el monitoreo post-comercialización de este evento (si éste ha sido liberado comercialmente en otros países), como así también las que resultaran de investigaciones realizadas con posterioridad a dichas liberaciones comerciales.

- En caso que corresponda, el solicitante declarará aquí si el tipo de modificación genética tiene el propósito de introducir diferencias que determinan que el OVGM no pueda considerarse sustancialmente equivalente al no OVGM, explicando sucintamente aquellas diferencias. (Ver también Capítulo1).
- Una historia de experimentaciones y ensayos previos, instrucciones sobre manejo (agronómico y del producto) y almacenaje (producto, subproductos y remanentes) si difieren del organismo no transgénico.
- Propuestas para el envasado, rotulado y procesamiento, si difieren del organismo no transgénico y *medidas que deben tomarse en caso de liberación accidental o mal empleo*.

**B) Caracterización general del OVGM:** esta información se concentra en la metodología y la construcción utilizada en la obtención del OGM y en la caracterización exhaustiva del mismo a nivel molecular y fenotípico. Se debe proporcionar información sobre:

- **La especie receptora** (características fenotípicas, centros de origen i diversidad, distribución geográfica en Argentina, estabilidad genética, potencial de transferencia y/o intercambio de genes con otros organismos, reproducción, supervivencia, diseminación, interacciones con otros organismos, características patogénicas, tóxicas, antinutricionales, alergénicas u otras, e historia de modificaciones genéticas previas).
- **La modificación genética:** método de transformación empleado, descripción detallada del vector (cada elemento genético componente, su origen, tamaño y función; mapa del vector; secuencias nucleotídicas o regiones de la construcción cuyos productos o funciones no sean conocidas; capacidad para transferir genes, o para ser movilizados por conjugación, recombinación o integración; regiones del vector que se incorporan al OGM, es decir constituyen el inserto).

- **Caracterización del inserto:** análisis molecular de la inserción en el genoma del OVGM (número de sitios de integración, número de copias de cada gen, incorporación de porciones de genes), origen y función de cada elemento insertado en el OVGM, información sobre si el inserto (esto es, alguno de sus elementos) confiere alguna función no requerida para la expresión del fenotipo esperado en el OVGM, transposiciones y/o rearrreglos dentro del inserto presente en la planta (con respecto a las posiciones que los elementos genéticos tenían en el vector) y/o de/con porciones del genoma de la planta dentro del inserto y en sus regiones flanqueantes; información detallada de las secuencias del genoma vegetal que flanquean del inserto y sobre la presencia/ausencia de fragmentos del inserto en regiones del genoma vegetal fuera del inserto funcional.
- **Los organismos donantes:** características patogénicas (con relación a las resultantes de la expresión de los elementos presentes en la construcción utilizada en la transformación). Características perjudiciales para la salud humana o animal (con la observación del punto anterior), potencial y/o antecedentes de transferencia natural (esto es, en hábitats y condiciones naturales) de los elementos que constituyen la construcción, desde los organismos donantes a otros organismos, su probabilidad o frecuencia, y fenotipos posibles u observados de los organismos receptores.
- **Caracterización del OVGM propiamente dicho:** características fenotípicas incorporadas, si alguna característica fenotípica del organismo receptor no GM no se expresa en el OVGM. Estabilidad genética, segregación y transferencia a la progenie. Análisis molecular (Southern blot, PCR). Características de la expresión del nuevo material genético. Productos expresados (debe incluir todos los elementos genéticos que se incorporan al OVGM, total o parcialmente), características de la expresión (p.ej.,

constitutiva, tejido-específica), tejidos del OVGGM en que se expresan los genes introducidos y niveles de expresión y su evolución temporal, en relación con el ciclo de la planta. Actividad biológica de las secuencias expresadas, ARNs transcritos no traducidos, sus niveles, función y caracterización. Análisis detallado de las posibilidades de transcripción, que comience dentro del inserto y se extienda hacia el genoma de la planta ignorando señales de terminación, así como de transcripción y traducción de proteínas de fusión o de marcos de lectura nuevos, generados como consecuencia de la inserción. También, se deben detallar las técnicas de detección del OVGGM en el ambiente: Métodos moleculares y Métodos biológicos:

- **Efectos sobre la salud humana:** efectos tóxicos o alergénicos del OVGGM, sus materiales derivados, sus productos metabólicos, los productos resultantes del procesamiento industrial habitual (incluyendo pero no limitado a alimentos), o los resultantes de interacciones de estos productos con otros componentes normales de la dieta humana. Efecto de la modificación genética sobre aquellas características del organismo no GM que constituyan un peligro o riesgo para la salud (incluyendo, pero no limitados a, los niveles de antinutrientes).
- **Interacciones del OVGGM con el ambiente:** supervivencia en el ambiente tasa de germinación y dormición, vigor vegetativo (calidad agronómica, susceptibilidad a patógenos, a insectos, a factores de estrés ambiental), ventajas adaptativas presentes o potenciales del OVGGM frente al organismo no GM, en hábitats y condiciones naturales, y en condiciones de agroecosistemas para la misma especie y para otros cultivos geográficamente compatibles. Los modos y tasas de multiplicación y las formas naturales de propagación. Información cuantitativa sobre interacciones: susceptibilidad a patógenos, plagas e insectos, capacidad de supervivencia (plantas voluntarias) y rendimiento.
- **Impacto ambiental del OVGGM en el agroecosistema:** efectos del OVGGM sobre la flora, fauna y población microbiana, con énfasis en las especies benéficas. Efectos derivados de cambios en las prácticas agronómicas (si los hubiera). Conceptos para el manejo de los efectos mencionados en los puntos anteriores y condiciones específicas para el manejo de efectos ambientales debidos al OVGGM. Estudios realizados sobre el escape de genes vía polen.
- **Comportamiento esperado en la producción del OVGGM a escala comercial:** esta información se refiere específicamente al impacto ambiental, a información general sobre la inocuidad del OVGGM o sus derivados alimentarios y a su perfil composicional.
- **Impacto Ambiental:** efectos sobre la flora y fauna, manejo de efectos no deseados potenciales (p.ej., desarrollo de resistencia a Bt en insectos previamente sensibles), programa de investigaciones de seguimiento propuesto, para monitorear posibles efectos sobre el ambiente en el largo plazo.
- **Efectos sobre la salud humana:** conceptos y programa de investigaciones que se realizaron para la evaluación de la inocuidad de las nuevas proteínas expresadas en el OVGGM; evaluación de la toxicidad, digestión en jugo gástrico simulado, a diferentes pH: velocidad, caracterización de los fragmentos originados y su actividad biológica. Toxicidad aguda de las nuevas proteínas en animales de laboratorio; determinación del nivel de efecto adverso no observable (sigla del inglés NOAEL), si es posible. Cálculo de la ingesta diaria aceptable (IDA), y su comparación con la ingesta habitual para humanos en dietas normales. Evaluación del potencial alergénico, homologías de las secuencias de aminoácidos de las nuevas proteínas con otras proteínas relevantes (toxinas, alérgenos, etc.). Composición centesimal del OVGGM, y comparación con el correspondiente organismo no GM, en

todos los tejidos de la planta; proteínas y composición en aminoácidos, lípidos y composición de ácidos grasos, carbohidratos y otros componentes (cenizas, fibra, materia seca, vitaminas, etc.).

Como se presenta en el esquema correspondiente, la evaluación completa y detallada de la inocuidad y aptitud alimentaria de los OVGMs es llevada a cabo por otra Comisión Evaluadora, que funciona en la órbita del SENASA (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Agroalimentaria). Las características de esta etapa de evaluación son similares a las que lleva adelante CONABIA, y basa sus conclusiones en toda la información presentada a CONABIA, más otra serie de datos, evidencias experimentales y estudios que deben ser presentados específicamente en relación con los **aspectos nutricionales y/o toxicológicos** del OVGM en cuestión, de acuerdo a los requisitos de la resolución oficial.

En ambas instancias de evaluación de bioseguridad se aplica el enfoque comparativo desarrollado en el Capítulo 1 y la conclusión a la que como mínimo, debe arribarse para poder recomendar la autorización comercial, es :

***“El OGM es tan seguro como su contraparte no modificada, para el medio ambiente y la salud humana o animal y no menos nutritivo”.***

### **Lecturas /sitios recomendados**

- Wolt J, Keese P, Raybould A, Fitzpatrick J, Burachik M, Gray A, Olin S, Schieman J, Sears M y Wu F 2009. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. Transgenic Res, DOI 10.1007/s11248-009-9321-9
- Burachik M y Traynor P. 2002. Análisis de a Nacional Biosafety System: Regulatory Policies and Procedures in Argentina. ISNAR Country report 63. [www.isnar.cgiar.org](http://www.isnar.cgiar.org)
- McLean, MA, Mackenzie, DJ and Cole, BA, 2001. Policy Choices in the Development of National Frameworks for Biosafety Regulation. Report for the International Service for National Agricultural Research (ISNAR), The Hague.
- Raybould A, Cooper I (2005) Tiered tests to assess

- the environmental risk of fitness changes in hybrids between transgenic crops and wild relatives: the example of virus resistant Brassica napus. Environ Biosafety Res 4(3):127–140
- USEPA (1998) Guidelines for ecological risk assessment, EPA/630/R-95-002F. Report nr EPA/630/R-95-002F
- [www.minagri.gob.ar](http://www.minagri.gob.ar) (Biotecnología Agropecuaria): normativa detallada que puede consultarse libremente
- [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar) : resolución 412/2002
- <http://www.cbd.int/biosafety/protocol.shtml>: Protocolo de Bioseguridad
- [www.ctnbio.gov.br](http://www.ctnbio.gov.br): sitio de la Comisión de Bioseguridad de Brasil
- [www.oecd.org](http://www.oecd.org): Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica
- [www.fda.gov](http://www.fda.gov): Agencia de Drogas y Alimentos de los EEUU
- [www.fao.org](http://www.fao.org): Agencia para la Agricultura y la Alimentación de la Naciones Unidas
- [www.redbio.org](http://www.redbio.org): ir a Marco Regulatorio, para información sobre bioseguridad en America Latina y el Caribe
- <http://www.unep.ch/biosafety/>: Programa ambiental de las Naciones Unidas . Información sobre el Protocolo de Bioseguridad y marcos regulatorios internacionales

## VI. CAPÍTULO 3

### Flujo génico y su posible impacto ambiental

Mónica Poverene; Soledad Ureta;  
Agustina Gutiérrez

#### Flujo génico y riesgo de escape de transgenes al ambiente

El flujo génico es el proceso de incorporación de genes de una población dentro de otra y ocurre entre individuos formalmente considerados una especie o entre especies relacionadas. El intercambio de genes entre plantas es un proceso bien conocido en todos los cultivos mejorados por técnicas tradicionales o mediante biotecnología y en las plantas silvestres emparentadas con ellos. La mayoría de los transgenes en cultivos comerciales genéticamente modificados (CGM) confieren tolerancia a herbicidas o resistencia a plagas, características ciertamente favorables en ecosistemas agrícolas. Se denomina escape a la diseminación no intencional de la construcción genética de un CGM hacia otras poblaciones, mediante mecanismos biológicos naturales como la reproducción sexual o la transferencia horizontal. La reproducción sexual implica la unión de gametos femeninos y masculinos, mientras que la transferencia génica horizontal o lateral consiste en el intercambio de material genético no sexual y ocurre generalmente en microorganismos. En el caso de las plantas, el escape génico a través del polen es el mecanismo natural. La pérdida de semillas durante el transporte y su establecimiento en banquinas y vías de comunicación es muy importante en la dispersión de plantas fuera del cultivo. La semilla puede trasladarse grandes distancias y sobrevive durante mucho más tiempo que el polen. En regiones donde crecen parientes silvestres, se espera que ocurra hibridación espontánea con el cultivo transgénico, a menos que las plantas GM estén especialmente diseñadas para limitar el flujo génico, reduciendo la dispersión de semillas o el movimiento de genes a través del polen. Para muchos CGM se asume que las plantas transgénicas se cruzarán abiertamente

y la evaluación del riesgo se centra en la consecuencia del flujo de transgenes resultante sobre el ambiente

En especies alógamas o parcialmente alógamas, la difusión del transgén dependerá de los mecanismos de polinización, generalmente por el viento (anemófila) o los insectos (entomófila). La mejor estrategia para prevenir la difusión de transgenes es el aislamiento por distancia entre poblaciones. En los cultivos, se conocen las distancias mínimas de aislamiento necesarias para prevenir la polinización cruzada entre variedades. Estas constituyen la base para determinar las medidas de bioseguridad que se exigirán en cada caso durante la fase de liberación experimental. Una vez aprobado el cultivo para su siembra a escala comercial, la aplicación de esas distancias en la práctica agronómica queda en manos de los agricultores y depende de los intereses económicos que para ellos represente la comercialización de un cultivo transgénico. Cuando coexisten con cultivos tradicionales u orgánicos se requieren medidas adecuadas durante el cultivo, cosecha, transporte y almacenamiento, a fin de evitar la mezcla accidental de materiales GM y no GM. Engels y col. (2006) citan ejemplos de contaminación de lotes de semilla y mezclas físicas en colza y tomate. Las recomendaciones tendientes a evitarla consisten en: a) medidas a tomar dentro del establecimiento, como respetar las distancias de aislamiento, colocar barreras a la dispersión del polen, o intercalar lotes con cultivo de una especie distinta. b) cooperación entre establecimientos vecinos sobre planes de siembra, o uso de variedades con tiempo de floración diferente. c) uso de servicios de extensión agrícola para informar a los productores, monitoreo, intercambio de información técnica y servicios de alarma.

Los transgenes que confieren tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos o a patógenos podrían transmitir las mismas características a plantas silvestres relacionadas, determinando una mayor supervivencia bajo la presión de selección natural (insectos herbívoros o patógenos) o de prácticas agronómicas usuales para el control de malezas, plagas o enfermedades (uso de pesticidas, agentes de control biológico). En consecuencia, aumen-

taría el número o tamaño de las poblaciones silvestres. El potencial impacto ambiental depende tanto de la probabilidad de transferencia del transgén a la población silvestre como de sus consecuencias. Según la probabilidad de transferencia, los cultivos pueden clasificarse en tres grupos:

1. Mínima probabilidad de transferencia a especies silvestres, sea porque éstas no existen en el área o no hay compatibilidad sexual entre el cultivo y su pariente silvestre.
2. Cultivos con baja probabilidad de transferencia, cuando la compatibilidad sexual es limitada.
3. Cultivos con alta probabilidad de transferencia, cuando especies silvestres sexualmente compatibles crecen en la vecindad del área sembrada.

Las consecuencias de la transferencia dependen de la capacidad potencial del transgén para conferir ventajas adaptativas a la especie silvestre receptora. De acuerdo a este criterio, también se pueden agrupar los genes en diferentes clases. En la clase 1 se sitúan los transgenes que confieren pequeña o ninguna ventaja adaptativa, como los marcadores de selección, genes de androesterilidad o de madurez retrasada. La clase 2 comprende genes que pueden conferir alguna ventaja bajo la adecuada presión de selección, como los de tolerancia a herbicidas o de resistencia a insectos y enfermedades. En la clase 3 se sitúan genes para mejorar el crecimiento y la supervivencia, que conferirían ventajas adaptativas en cualquier ambiente. La tabla 1 presenta una clasificación de los cultivos GM autorizados o bajo ensayo en Argentina, según esos criterios.

La pérdida de biodiversidad consiste en la erosión o pérdida de variabilidad genética atribuida al monocultivo o al uso de unas pocas variedades que dominen el mercado de semillas. Esta situación no es privativa de los cultivos GM y puede prevenirse mediante una adecuada planificación de la agricultura regional. Algunas especies crecen en ambientes especializados o geográficamente limitados como raras especies silvestres o razas locales domesticadas (*landraces*) constituyendo reser-

vorios de diversidad genética de potencial uso en el mejoramiento genético. Cuando crecen en la vecindad de cultivos a gran escala, existe la posibilidad de cruzamientos naturales y flujo génico a través del polen del cultivo hacia la especie local. Esto puede resultar en una pérdida de vigor y fertilidad en los descendientes, llamada depresión por alogamia, o pérdida de identidad genética por sucesivos ciclos de cruzamiento con el cultivo, de manera que paulatinamente la especie local decae hasta su completa extinción. El proceso es dependiente de la frecuencia de cruzamiento, la cual a su vez depende de la cantidad relativa de individuos de cada especie. Esto también puede evitarse mediante adecuadas medidas de conservación y manejo del cultivo.

Se puede concluir que la posibilidad de escape de transgenes es de orden diferente según la población receptora. Una variedad no GM de la misma especie ciertamente adquirirá el transgén si es expuesta al flujo de polen del cultivo GM. Una rara variedad local domesticada perderá identidad por contacto genético con el cultivo. La situación no es tan simple si se trata de una población silvestre emparentada, ya que dependerá de las relaciones genéticas con el cultivo, que determinan la probabilidad de hibridación. Se requerirá de una evaluación de la probabilidad de escape y del impacto que el transgén podría ocasionar en la población silvestre.

### **Factores que determinan el escape de transgenes y su impacto ambiental**

Los cultivos en su mayoría están emparentados con especies silvestres o malezas, con las que pueden hibridar y producir descendientes total o parcialmente fértiles. Esta hibridación ha sido documentada en 22 de los 25 cultivos más importantes y es muy probable que sus genes se encuentren introgresados dentro de las poblaciones silvestres. Trigo, arroz, avena, sorgo, cebada, maíz, soja, girasol, colza, maní, poroto, caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, papa, zapallo, frutilla, rábano, zanahoria, vid, tréboles son algunas de las especies cultivadas que se encuentran en experimentación biotecnológica. El intercambio genético de los cultivos con sus parientes silvestres es

**Tabla 1.** Clasificación de las especies GM en Argentina según la probabilidad de transferencia del transgén (Grupo) y las consecuencias biológicas de la modificación genética (Clase) de acuerdo a Ahl Goy y Duesing (1996). Entre paréntesis se indica el número de autorizaciones entre 1997 y 2007.

Grupo	Cultivo	Clase 1	Clase 2	Clase 3
I	Algodón		Toler. herbicidas (47) Resist. insectos (46)	
	Maíz	Calidad alterada (68) Caracteres agronómicos (2) Androesterilidad (3)	Toler. herbicidas (463) Toler. estrés ambiental (20) Resist. insectos (564) Resist. enfermedades (12)	Alto rendimiento (4)
	Soja	Calidad alterada (64) Modif. calidad de semilla (1)	Toler. herbicidas (145) Tolerancia estrés ambiental (1) Resist. insectos (53)	Alto rendimiento (97)
	Tabaco	Calidad alterada (3)	Toler. herbicidas (20) Resist. enfermedades (1) Toler. estrés ambiental (4)	
	Trigo	Calidad alterada (5) Calidad de marcadores visuales (1)	Toler. herbicidas (6) Resist. enfermedades (7) Toler. estrés ambiental (1)	
	II	Caña de azúcar		Toler. herbicidas (11) Resist. enfermedades (2)
Papa			Toler. herbicidas (56) Resist. enfermedades (205) Resist. insectos (2)	
III	Alfalfa	Calidad alterada (2) Propiedades nutraceuticas (31)	Toler. herbicidas (6) Resist. insectos (2)	
	Arroz	Calidad alterada (3)	Toler. herbicidas (2) Tolerancia estrés ambiental (4)	Alto rendimiento (27) Alteración en la fertilidad (2)
	Cártamo	Calidad alterada (3)		
	Colza	Calidad alterada (1)	Toler. herbicidas (7) Resist. insectos (1)	
	Frutilla		Resist. enfermedades (1)	
	Girasol		Toler. herbicidas (3) Resist. enfermedades (49) Resist. insectos (31)	Fijación de nitrógeno (1)
	Naranja		Resist. enfermedades (3)	
	Remolacha, Acelga		Toler. herbicidas (3)	
	Tomate		Resist. enfermedades (1)	
	Trébol blanco			Retraso de la senescencia (1)

uno de los mecanismos de origen de las malezas. Los cruzamientos ocurren naturalmente en regiones donde las especies conviven. Aproximadamente la mitad de los caracteres que determinan invasividad están controlados por genes únicos, de modo que existe la posibilidad de que los transgenes persistan y modifiquen poblaciones silvestres. Podría resultar que éstas se vuelvan más abundantes en su hábitat o invadan nuevos hábitats. El concepto de "supermaleza" ha surgido como consecuencia de reconocer la dificultad que implicaría el control de esas poblaciones. También podrían tener efectos adicionales sobre poblaciones de insectos o patógenos.

No obstante, la probabilidad de introgresión de elementos transgénicos dentro de otras variedades o germoplasmas dependerá de la biología de reproducción, fertilidad de los híbridos, dispersión de semilla y presión de selección. Para que ocurra introgresión de genes, cultivos sexualmente compatibles o parientes silvestres deben estar presentes y cercanos al "cultivo fuente", el entrecruzamiento debe ser posible y los resultantes híbridos y sus respectivas retrocruzas tienen que ser fértiles. La introgresión de genes es mayor en especies alógamas, como maíz y es menor en autógamias, como soja y arroz, siendo mínima en especies de propagación vegetativa, como papa. Aún en estos casos los transgenes pueden ser introducidos sin intención mediados por mezclas físicas de semillas o propágulos.

La evaluación del riesgo de escape de transgenes comprende tres etapas:

a) Investigación de barreras genéticas o geográficas para el escape del transgén desde el cultivo hacia las poblaciones silvestres.

b) Investigación del efecto del transgén sobre la aptitud biológica de las plantas silvestres.

c) Investigación de las consecuencias ecológicas de la difusión del transgén en la población silvestre.

#### **a. Barreras geográficas y genéticas entre el cultivo y especies silvestres**

Para evaluar el riesgo de escape de genes desde los cultivos a las poblaciones silvestres emparentadas, se plantean dos preguntas: ¿La planta cultivada transgénica convive con la

especie silvestre emparentada? ¿Esa variedad es sexualmente compatible con sus parientes silvestres? Todas las especies utilizadas para cultivo son derivadas de una o más especies silvestres. Estos cultivos son sembrados en su mayoría lindantes con sus parientes silvestres compatibles. Para reducir el riesgo de hibridación cultivo-silvestre se debería restringir el cultivo transgénico a determinadas áreas donde no se encuentren los parientes silvestres. Por ejemplo, las poblaciones silvestres de maíz y soja no son nativas ni se encuentran en Argentina, por lo tanto los transgenes provenientes de estos cultivos no pueden transferirse a poblaciones silvestres. En cambio, colza, arroz y girasol conviven con sus parientes silvestres y pueden cruzarse con ellos. El primer paso consiste en el estudio sistemático de la flora local. De todos modos, restringir los cultivos transgénicos a determinadas áreas fuera del rango de ocurrencia de sus parientes silvestres sólo demorará el movimiento de transgenes.

La hibridación del cultivo con especies silvestres emparentadas dependerá de la afinidad genética que tengan entre ellos, la cual determinará desde fertilidad completa o parcial hasta imposibilidad de cruzamiento. Para que la cruce tenga lugar, ambos *taxa* deben florecer al mismo tiempo y el polen debe ser capaz de germinar y efectuar la fecundación. La descendencia suele tener una fertilidad menor que las especies parentales, pero raramente es por completo estéril. La fertilidad parcial de los híbridos permite la introgresión, la incorporación estable de genes de una especie en otra mediante sucesivas retrocruzas de sus descendientes con una o ambas especies parentales. La fertilidad de los híbridos cultivo-silvestre varía drásticamente, aunque suele ser restaurada en las siguientes generaciones. Caracteres morfológicos y fenológicos intermedios entre la especie cultivada y la silvestre constituyen un buen diagnóstico de hibridación e introgresión, pero el estudio de marcadores moleculares resulta invaluable. Este ha demostrado que la mayor parte de los cultivos hibrida con sus parientes y que los alelos de las especies domesticadas persisten durante generaciones en las poblaciones silvestres, aún cuando no se adviertan cambios morfológicos. Este es el caso

del girasol cultivado con *Helianthus annuus* silvestre y *H. petiolaris* en América del Norte. En Argentina, donde ambas especies silvestres se han naturalizado, hemos encontrado numerosas evidencias de hibridación e introgresión con el cultivo en la región central del país, tanto por caracteres morfológicos y fenológicos como por marcadores moleculares, constatando además la fertilidad parcial de los híbridos mediante estudios del polen y de la producción de semillas. El flujo génico a través del polen es una poderosa fuerza evolutiva y el impacto sobre las poblaciones silvestres depende de su magnitud, así como del efecto de los alelos transmitidos sobre la población recipiente.

La magnitud del flujo mediado por polen puede medirse a través de la frecuencia de marcadores moleculares característicos del cultivo presentes en una población silvestre o sus descendientes. Estos han demostrado que la ubicación de un gen en el genoma tiene una importancia crucial para su difusión mediante hibridación. En colza, un alopoloide (AACC), la introgresión de tolerancia a herbicidas y androesterilidad hacia la especie diploide *Brassica rapa* (AA) sería menos probable si los transgenes que codifican esos rasgos estuvieran en el genoma C, porque implicaría una recombinación intergenómica. En girasol, *Helianthus annuus* donde ha ocurrido una extensa remodelación cromosómica mediante inversiones y translocaciones, la transferencia de un transgén hacia la especie silvestre *H. petiolaris* es improbable si éste no está situado en las porciones colineares entre ambos genomas.

Se están evaluando métodos para reducir la probabilidad de introgresión, como por ejemplo, ubicar los transgenes dentro de cromosomas o segmentos cromosómicos que tengan menor probabilidad de ser transferidos a las poblaciones silvestres. Otra alternativa es colocar el transgén muy cercano a algún "gen de domesticación" que confiera una menor aptitud en las poblaciones silvestres y el uso de tecnologías de restricción para controlar la viabilidad o fertilidad de la progenie híbrida.

La cuantificación de la tasa de hibridación e introgresión entre el cultivo y la especie silvestre mediante experimentos adecuados es previa a la investigación de las consecuencias génicas y ecológicas del escape del transgén,

ya que si la tasa de hibridación fuera despreciable, no cabría preocuparse por las consecuencias.

### **b. Efecto del transgén sobre la aptitud biológica de las plantas silvestres**

Una vez comprobada la posibilidad de hibridación y la presencia de un transgén en plantas silvestres, surge la pregunta: ¿Se espera que el transgén incremente su frecuencia en las poblaciones silvestres? El destino de un alelo en una población dependerá de su efecto sobre la aptitud biológica de los individuos que lo adquieren. La aptitud biológica o valor adaptativo es una medida relativa de la eficacia reproductiva de un genotipo cuando se lo compara con otro genotipo. Sus componentes son la supervivencia y la fecundidad, que pueden resultar afectados en distintas fases del ciclo vital: germinación, establecimiento de plántula, floración, formación de polen y semilla.

Si el alelo no tiene efecto alguno en el ambiente ecológico, se trata de un alelo neutro y su destino dependerá del azar, o sea que su frecuencia en la población estará sujeta a la deriva génica y persistirá o eventualmente se perderá. Si el alelo es beneficioso, el flujo génico acelerará su diseminación en la población silvestre y la frecuencia alélica aumentará rápidamente, en forma proporcional al movimiento de polen desde el cultivo a la población silvestre. Si su efecto es deletéreo conducirá a una depresión alogámica, con disminución de la viabilidad y fertilidad de los híbridos. El efecto nuevamente dependerá de la magnitud del flujo génico y cuanto mayor sea, mayor será el riesgo de extinción de la población silvestre.

La diseminación de un transgén en la población silvestre requiere que los híbridos cultivo-silvestre se reproduzcan en condiciones naturales. Estudios previos de hibridación entre cultivos no transgénicos de colza, sorgo, girasol, rábano, poroto y trigo y sus parientes silvestres han demostrado que no sólo lo hacen, sino que su aptitud biológica puede ser incluso mayor que la de sus progenitores silvestres. En uno de los primeros estudios de transmisión de un transgén a poblaciones silvestres, se encontró una baja frecuencia de plantas híbridas de *Brassica rapa* portadoras de un transgén de

colza considerado neutral y se concluyó que el riesgo de transmisión era bajo. Diez años después se confirmó la persistencia de transgenes de resistencia a herbicida en poblaciones de *B. rapa* durante seis años consecutivos. Los híbridos entre calabaza GM y zapallo silvestre resultaron lo suficientemente vigorosos como para permitir la rápida introgresión de transgenes neutrales y beneficiosos en las poblaciones silvestres. En girasol, un transgén que confiere resistencia a lepidópteros mediante la producción de la proteína Bt Cry1Ac, aumentó considerablemente la fecundidad de las plantas silvestres recipientes, aunque este efecto varió entre localidades y años. De acuerdo a estas observaciones, podría esperarse que el gen Bt aumente la aptitud biológica de girasoles silvestres e incremente rápidamente su frecuencia en las poblaciones naturales, debido a que reduce el daño producido por varias especies de insectos herbívoros. Sin embargo, el transgén OxOx, que confiere resistencia al hongo *Sclerotinia*, no aumentó significativamente la fecundidad de plantas de girasol silvestre, sugiriendo que su diseminación sería prácticamente neutral luego de un escape hacia poblaciones naturales. En *Brassica rapa* un transgén Bt adquirido por cruzamiento con colza transgénica disminuyó su agresividad como maleza en un 20% comparado con *B. rapa* no GM. Estos son ejemplos contrastantes de los efectos de transgenes sobre la aptitud y comportamiento ecológico de poblaciones silvestres.

¿Cómo estimar los costos y beneficios de un transgén para la aptitud biológica de una especie silvestre? En este caso, los genotipos a comparar son el que ha adquirido el transgén por hibridación con el cultivo y el que no lo ha adquirido, o sea el genotipo silvestre de la población en ausencia de flujo génico del cultivo. En general, las poblaciones silvestres son menos susceptibles a patógenos y plagas que sus parientes cultivados. Mayor diversidad genotípica, menor densidad de plantas y ausencia de laboreo son algunas de las causas de esa diferencia. Por ello, un transgén que confiere resistencia a una plaga o patógeno puede no representar para la especie silvestre una ventaja tan grande como para el cultivo. Por el contrario, puede significar un costo para la

planta que lo adquiera debido a efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres fenotípicos que a su vez afecten la aptitud. El beneficio de un transgén asociado a la resistencia a determinada plaga debe ser evaluado comparando la aptitud biológica de plantas con y sin el transgén que hayan sido expuestas a esa plaga. Por el contrario, el costo de adquirir el transgén debe ser medido comparando la aptitud biológica de plantas que lo llevan o no, en ausencia de la plaga. Híbridos transgénicos entre *B. rapa* y *B. napus* que contienen el transgén Bt han demostrado una mayor aptitud en presencia de herbívoros, mientras que su aptitud disminuía en ausencia de los mismos comparado con *B. rapa*, demostrando un costo fisiológico del transgén. Además, los caracteres que determinan supervivencia y fecundidad pueden ser afectados por las condiciones ambientales, por lo que es necesario estimarlos en distintos ambientes y a lo largo de varias estaciones de crecimiento.

Es el equilibrio de los costos y beneficios el que determina el impacto total de un transgén en términos de aptitud. En el caso de resistencia a herbicidas, el valor positivo del rasgo será restringido a los hábitats en el agroecosistema en donde se aplica el herbicida. Esto demuestra la importancia de conducir estudios de riesgo en híbridos transgénicos bajo condiciones realistas de agricultura y ecología ya que cualquier costo de llevar transgenes puede ser evidente solamente bajo ciertas condiciones.

### **c. Consecuencias ecológicas de la difusión del transgén en la población silvestre**

Finalmente, si el transgén aumenta la aptitud de las poblaciones silvestres se espera que aumente su frecuencia por selección natural. La siguiente pregunta es: ¿Cuáles son las consecuencias ecológicas del escape del transgén en una población silvestre? El impacto ambiental dependerá no sólo de la frecuencia, sino del cambio en las interacciones bióticas y abióticas de ese genotipo silvestre en su ambiente. La predicción de las consecuencias de un escape de transgenes requiere del estudio de la alteración de las interacciones ecológicas existentes entre las especies. Un gen de resistencia a in-

sectos o a enfermedades modificará la herbivoría o la relación huésped-patógeno entre la especie silvestre y otras especies de su hábitat, así como un transgén que favorezca el crecimiento modificará las relaciones de competencia intra e interespecíficas. Cuanto más se conozca acerca de la dinámica poblacional de una especie, más fácilmente se podrá evaluar el impacto ambiental. En *Cucurbita pepo*, híbridos entre un cultivar GM y plantas silvestres mostraron amplias variaciones en fecundidad entre años y localidades que fueron atribuidas a condiciones de suelo y clima, densidad de herbívoros, competencia con malezas, enfermedades y otros factores ambientales. El crecimiento poblacional a través de la producción de semilla es una limitante para especies anuales, por ello caracteres que aumenten la producción o germinación de semilla tienen un gran efecto ecológico. Resultados preliminares en poblaciones experimentales de girasol silvestre sometidas a flujo génico de un cultivo GM (Bt) indicaron que el aumento de la producción de semilla determinó mayor número de plántulas, mayor supervivencia hasta la edad reproductiva, mayor número de inflorescencias con semilla y mayor área total de capítulo al año siguiente. El incremento en tamaño y número de las poblaciones silvestres de una especie afectará a otras especies vegetales del hábitat, cuya frecuencia relativa podría disminuir.

Uno de los riesgos asociados al escape de un transgén Bt de resistencia a insectos en una población silvestre es el potencial efecto adverso sobre especies no-blanco (aquellas que no reducen la producción del cultivo) algunas de las cuales pueden ser especialistas, alimentándose con exclusividad de la especie silvestre receptora. Como ejemplo, se pueden citar especies de artrópodos que cumplen importantes funciones como controladores biológicos, polinizadores y descomponedores. Las toxinas Bt son altamente específicas para determinados tipos de herbívoros (lepidópteros, coleópteros, dípteros) y la disminución de uno de ellos puede alterar las relaciones de competencia con los demás. Las relaciones ecológicas entre herbívoros suelen implicar un delicado equilibrio demográfico cuyo colapso podría contribuir a mayores niveles de infestación y daño.

El uso comercial de cultivos Bt ejerce una presión selectiva que podría favorecer la selección de insectos resistentes a las toxinas. La descendencia podría heredar los genes de resistencia y en unos pocos años, la biotecnología desarrollada para el control de insectos se volvería inefectiva. Para evitar esta situación se ha ideado la estrategia del cultivo refugio, que consiste en sembrar una franja de variedad no transgénica junto a la variedad Bt. Los insectos se reproducen libremente en esa franja, de modo que los raros portadores de resistencia se mantendrán en una frecuencia relativamente baja en la población total de insectos. Esta estrategia se detalla en el capítulo 5. En cultivos de algodón y maíz el sistema de refugios es efectivo y ayuda a retrasar la resistencia en insectos. La pérdida de la eficacia Bt es actualmente uno de los mayores riesgos ambientales derivados del uso de biotecnología agrícola. El primer caso de insectos Bt-resistentes seleccionado en laboratorio se encontró en una población de *Plodia interpunctella*. Sin embargo, la situación en el campo es muy diferente. Hasta la fecha, las únicas poblaciones naturales que han desarrollado resistencia a Bt han sido poblaciones de *Plutella xylostella* (L.) en plantas de berro en Hawai.

La transgénesis también puede tener efectos inesperados en los cultivos. El contenido de lignina del maíz Bt es perceptiblemente más alto que el de maíz no-Bt. Un cambio en el contenido de lignina puede afectar la acción de herbívoros y tener consecuencias ecológicas.

### Conclusiones

El estudio de impacto ambiental precede a la liberación de cualquier nuevo evento de transformación en plantas para tener resultados confiables en el ambiente de la liberación. La mayor parte de los efectos no deseados del escape de un transgén pueden evitarse mediante acciones planificadas anticipadamente: manejo del cultivo, bancos de germoplasma, cultivos refugio, etc. Sin embargo, la difusión de un transgén hacia poblaciones silvestres emparentadas es difícil de evitar debido a que el polen de los cultivos puede alcanzar grandes distancias. Los cultivos GM ya se utilizan en gran escala, por lo que es necesario evaluar

cuidadosamente el riesgo de escape de transgenes para cada uno de ellos. Esa evaluación, realizada por equipos multidisciplinares, debería considerar los siguientes aspectos: a) Presencia de especies silvestres sexualmente compatibles con el cultivo y la probabilidad de que el transgén difunda en ellas. b) Cambios en las características de poblaciones de patógenos, insectos y malezas relacionadas con el cultivo GM y medidas para evitar o retardar la aparición de biotipos resistentes. c) Cambios en la dinámica de poblaciones de otras especies vegetales y animales que comparten el hábitat (polinizadores, parásitos y predadores, microflora y fauna del suelo).

### Lecturas recomendadas

- Adam, D. 2003. Transgenic crop trial's gene flow turns weeds into wimps. *Nature* 421:462.
- Ahl Goy P, Duesing JH. 1996. Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Biotechnology* 14: 39-40.
- Burke JM, Rieseberg LH. 2003. Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 300: 1250.
- Clark A. 2006. Environmental risks of genetic engineering. *Euphytica* 148: 47-60
- Craig W, Tepfer M, Degrassi G, Ripandelli D. 2008. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-007-9643-8.
- Ellstrand NC. 2003. *Dangerous Liasons? When cultivated plants mate with their wild relatives.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Engels JMM, Ebert AW, Thormann I, de Vicente MC. 2006. Centres of crop diversity and/or origin, genetically modified crops and implications for plant genetic resources conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1675-1688.
- Hails RS, Morley K. 2005. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 245-252.
- Hills MJ, Hall L, Arnison PG, Good AG. 2007. Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement. *Trends in Plant Science* 12: 177-183.
- McGaughey WH. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. - *Science* 229: 193-195.
- Pilson D, Prendeville HR. 2004. Ecological effects of transgenic crops and the escape of transgenes into wild populations. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35:149-174.
- Sanchis V, Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agron Sustain Dev* 28: 11-20.
- Scott SE, Wilkinson MJ (1998) Transgene risk is low. *Nature* 393: 320
- Snow AA, Pilson D, Rieseberg LH, Paulsen MJ, Pleskac N, Reagon MR, Wolf DE, Selbo SM (2003) A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecological Applications* 13: 279-286
- Spencer LJ, Snow AA (2001) Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 86: 694-702
- Vacher C, Weis AE, Hermann D, Kossler T, Young C, Hochberg ME (2004) Impact of ecological factors on the initial invasion of Bt transgenes into wild populations of birdseed rape (*Brassica rapa*). *Theor Appl Genet* 109: 806-814
- Warwick SI, Légère A, Simard MJ, James T (2008) Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17: 1387-1395.

## VI. CAPÍTULO 4

### Detección de OGM en la Cadena Agroalimentaria

Florencia Longo; Ana Vicario

#### Introducción

En el año 1996 se aprobó para su comercialización en Argentina la primera variedad vegetal mejorada que llevaba una característica transgénica. Se trató de una variedad de soja con tolerancia a un herbicida. A partir de ese momento y hasta la actualidad Argentina ha aprobado 10 eventos transgénicos más: 9 en maíz y 2 en algodón.

A grandes rasgos, una planta genéticamente modificada es aquella a cuyo genoma se han incorporado uno o más transgenes mediante alguna de las técnicas de ingeniería genética. Estos transgenes poseen una secuencia nucleotídica específica y algunos de ellos se expresan generando una proteína nueva en el organismo, lo cual le va a conferir un nuevo fenotipo, o característica especial a la planta.

Según la definición de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA), un organismo genéticamente modificado (OGM), "es un organismo al cual se le ha introducido, en forma deliberada y controlada, alguna modificación en su material genético haciendo uso de las técnicas modernas de biología molecular. Esta modificación consiste en incorporar información para conseguir que el organismo adquiera una determinada característica que antes no poseía". Se denomina entonces "evento transgénico" a un OGM caracterizado por un segmento específico de ADN nuevo que se ha insertado de manera definida y controlada en el genoma original".

Mundialmente existen otros eventos aprobados por distintos países, en otras especies como colza, alfalfa, papaya y tomate, entre otros ([www.ISAAA.org](http://www.ISAAA.org)). Según datos de la International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), en el año 2007 existían 23 países que cultivan semillas transgénicas, siendo los ocho principales Estados

Unidos, Argentina, Brasil, Canadá, India, China, Paraguay y Sudáfrica. Dentro de los países de la Unión Europea se encuentran Francia, España y Polonia quienes cultivan semillas con algunos de los eventos existentes. En total suman 114,3 millones de hectáreas OGMs para sembradas con la campaña 2007/2008.

La aplicación de la biotecnología moderna en la cadena de producción de los alimentos ha generado grandes controversias en todo el mundo. Esto ha provocado que muchos países, especialmente los de la Unión Europea, impongan restricciones al ingreso de productos que contengan organismos modificados genéticamente. Así se han generado normativas que regulan las transacciones internacionales de estos productos, como el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Este protocolo establece un sistema regulatorio para el intercambio y manejo de los organismos vivos genéticamente modificados, con especial énfasis en su movimiento transfronterizo. Esto requiere de entrenamiento especializado tanto en técnicas de laboratorio como de gestión de la producción y de la armonización internacional de estos métodos.

Aunque las normas de etiquetado y comercialización de granos genéticamente modificados (GM) y sus derivados difieren de un país a otro, en todos los casos se requiere de metodologías capaces de detectar niveles muy bajos de proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN), semillas o granos GM, éstos últimos, con distinto grado de procesamiento industrial, y para los cuales se puede solicitar determinar tanto la presencia de estructuras comunes a cualquier evento (lo que se denomina "screening") como la de eventos particulares y su cuantificación.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia que se introduce en un OGM puede dar origen a una proteína y ésta, a su vez, a un determinado fenotipo. Es por eso, que para determinar la presencia de organismos transgénicos en una muestra o lote de un determinado producto, se podrá verificar la presencia de determinadas secuencias de ADN, de proteínas o de características fisiológicas de las plantas. Estas determinaciones podrán ser de tipo cualitativa o cuantitativas, dependiendo del método analítico se que utilice.

A continuación se detallan los métodos y enfoques de análisis más utilizados. Asimismo, se enuncian algunas consideraciones generales al momento de llevar adelante los ensayos y la estructura física que se recomienda que dispongan los laboratorios que realizan este tipo de ensayos. Finalmente se hace una revisión de las normas internacionales que existen en la materia.

## **Estrategias de análisis**

### **Ensayos cualitativos**

Los ensayos cualitativos se refieren a aquellos que dan una respuesta positiva o negativa respecto de la presencia de un analito. Es decir, en el caso de los transgénicos, aquellos que determinan presencia o ausencia de una secuencia de ADN, de proteína o fenotipo debido al transgén. Un ensayo típicamente cualitativo es el bioensayo, pero también lo es una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en tiempo final, un análisis de proteínas utilizando tiras reactivas o un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) cualitativo.

### **Ensayos semi-cuantitativos: sub-muestreo**

Estos ensayos implican el análisis de una determinada cantidad de sub-muestras de análisis (grupos o “*pooles*”). Para cada sub-muestra, la presencia o ausencia de un determinado analito, se determina de manera cualitativa. La estrategia radica en el análisis de una determinada cantidad de grupos (N) de tamaño conocido de semillas o granos (m) y la estimación estadística (siguiendo una distribución binomial o de poisson) del porcentaje de analito presente en la muestra. Existen planillas de cálculo con ayuda de las cuales se puede decidir sobre el número de semillas o granos a utilizar y el tamaño y cantidad de grupos, según un porcentaje de confianza establecido para la prueba y un límite máximo de OGM aceptado para la muestra o lote en estudio (Programa estadístico SeedCalc v8).

Esta estrategia puede llevarse a cabo utilizando tanto una PCR en tiempo final como ensayos para determinación de proteínas (ensayo inmunológico del tipo ELISA en placa o tiras

reactivas), teniendo en cuenta que el tamaño de los grupos de análisis no debe ser mayor a la sensibilidad del método utilizado (es decir, si el método es capaz de detectar una semilla transgénica en 500 semillas, los grupos de análisis no deben ser mayores a 500 semillas).

### **Ensayos cuantitativos**

Los ensayos cuantitativos se refieren a la determinación del porcentaje de OGM en una muestra o lote. Esta cuantificación es posible debido a la metodología empleada y no debido a una estimación estadística, como en el caso del sub-muestreo. La técnica cuantitativa por excelencia, ampliamente utilizada en las transacciones comerciales, es la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa.

## **Métodos de Detección**

### **Bioensayos**

Este método cualitativo consiste en la evaluación de la respuesta fisiológica de manera de determinar la presencia del transgén buscado, como por ejemplo la tolerancia a un herbicida. En el caso de plantas tolerantes a un herbicida, el ensayo consiste en poner a germinar las semillas y evaluar la emergencia de plántulas normales bajo el efecto del herbicida. El porcentaje de plántulas tolerantes se determina contando a aquellas normales sobre las semillas totales. Paralelamente a este ensayo debe realizarse el ensayo control, que consiste en la prueba de germinación sin el herbicida, de manera de determinar el poder germinativo de la muestra.

La evaluación de la resistencia a insectos se realiza mediante ensayos biológicos complejos y de larga duración, y es por eso que los bioensayos no son una alternativa práctica para dicha característica.

El bioensayo para tolerancia a herbicida requiere aproximadamente una semana para completarse, o el tiempo que tome lograr obtener una plántula para la especie en estudio. La cantidad de semillas a evaluar se determina según el porcentaje de confianza con el que se desee realizar la prueba y en función del límite máximo de OGM aceptado para la muestra o lote ([www.seedtest.org](http://www.seedtest.org)).

### **Determinación de proteínas**

Las proteínas producto de la expresión de un transgén pueden determinarse utilizando una reacción inmunológica de tipo proteína GM-anticuerpo que es posible realizar tanto en placa (ELISA), como sobre un soporte de nitrocelulosa (tiras reactivas o *immunostrips*). Básicamente estos ensayos consisten en la detección de la sustancia de interés (la proteína) mediante la formación de un complejo antígeno-anticuerpo que luego es detectado mediante un complejo enzimático que se une específicamente al complejo anterior permitiendo su visualización. Es aconsejable que se realicen sobre semillas/grano u otro material vegetal “joven”, ya que las proteínas se degradan con facilidad, y es por eso también que no se recomienda su uso para casos de alimentos procesados.

El nivel de expresión de las proteínas varía según el tejido del que se trate, desde niveles muy altos hasta trazas casi imperceptibles. Es por eso que se recomienda, además de seguir -en el caso de utilizar los “kits” comerciales-, las instrucciones del fabricante, contar con los correspondientes controles de los ensayos. Utilizando esta metodología se pueden obtener resultados en unas pocas horas. Según el evento transgénico del que se trate, los niveles de proteínas varían en los distintos tejidos de la planta. Pueden ser mucho más altos en hojas o raíces y prácticamente nulos en granos y por lo tanto es bueno considerarlo antes de tomar decisiones sobre los ensayos a realizar. Para obtener más información sobre tejidos de expresión de proteínas transgénicas se puede consultar el sitio AGBIOS (<http://www.agbios.com>).

Asimismo, hay que considerar que distintos eventos transgénicos han incorporado las mismas proteínas por lo que no es posible, en estos casos, determinar de qué evento se trata si el resultado es positivo.

Este tipo de análisis solo tiene utilidad cuando se lo realiza sobre muestras o tejidos que expresan la proteína GM y en productos sin procesamiento como hojas, granos y los primeros productos de la molienda, pero no en alimentos donde las proteínas se desnaturalizan por completo y pierden sus propiedades inmunológicas. Por otra parte, la detección de

la proteína GM depende de que ésta se exprese en el tejido de análisis. Puede ocurrir que no sea posible generar un anticuerpo para detectar la proteína introducida debido a que es muy similar a proteínas propias de la planta original y por lo tanto no se pudo obtener un anticuerpo que detecte a la proteína introducida sin detectar también la ya presente en la planta, lo que se denomina reacción cruzada.

La determinación de proteínas es un ensayo de tipo cualitativo, aunque en el caso de ELISA en placa, es posible ajustarlo de manera tal de poder realizar una determinación cuantitativa. En el caso que se realicen ensayos utilizando una estrategia de sub-muestreo, debe tenerse en cuenta el nivel de sensibilidad del ensayo (tanto en ELISA como en tiras reactivas). La cantidad de semillas o granos a evaluar así como la cantidad de grupos y su tamaño, se determina según el porcentaje de confianza con el que se desee realizar la prueba y en función del límite máximo de OGM aceptado para la muestra o lote ([www.seedtest.org](http://www.seedtest.org)).

Este tipo de determinación es sencilla de realizar y no necesita alta capacitación del personal ni materiales o equipos sofisticados. Entre los inconvenientes que presenta se encuentran que no permite la identificación entre cultivos distintos que presentan la misma proteína GM (ya sea en cuanto a especie o con relación a la construcción introducida). Sumado a ello, es preciso aclarar que su utilización para la cuantificación puede conducir a errores debido a las diferencias en los niveles de expresión de la proteína GM por el origen del tejido, su variación con la edad de la planta o por el efecto de las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla.

Existe una gran diversidad de anticuerpos para distintas proteínas provenientes de un transgén. Se puede obtener más información visitando las páginas web de distintos proveedores.

### **Determinación de secuencias transgénicas**

La determinación de secuencias de ADN, molécula que lleva la información genética de un organismo, es uno de los ensayos más utilizados para estudiar la presencia de un tran-

gén. Este análisis se lleva a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, o PCR en sus siglas en inglés.

Esta reacción imita lo que ocurre naturalmente al momento de duplicarse la carga genética de una célula (duplicación del ADN), sólo que en este caso se copia un solo y relativamente pequeño fragmento de ADN de manera tal de generar miles de copias. La PCR es una reacción química exponencial, es decir, a partir de un fragmento de ADN, se obtienen dos, y de esos dos, cuatro y luego ocho, etc. Esto hace que luego de 30 ciclos de amplificación, se obtengan miles y miles de fragmentos iguales, permitiendo así la visualización de los mismos. Esta visualización puede hacerse mediante distintos procedimientos. Los más frecuentes son en geles de agarosa, geles de poliacrilamida o sistemas cuantitativos de detección como en el caso de la PCR en tiempo real.

La PCR es un proceso altamente específico que permite determinar el evento transgénico que contiene una muestra, algo que no se puede lograr de manera fehaciente con los otros métodos, como los que nos permiten evaluar una respuesta fisiológica o la presencia de determinadas proteínas. Esta especificidad está dada por los “*primers*” o cebadores que son pequeños fragmentos de ADN que reconocen la secuencia a amplificar y se adhieren a ella (lo que se conoce como “*annealing*”) permitiendo iniciar la reacción de amplificación. Distintos “*primers*” son capaces de pegarse en diferentes zonas del fragmento de ADN introducido. Estas zonas son cuatro: *secuencias promotoras* o *terminadores* que suelen ser comunes a varios eventos; el *gen* que confiere el carácter específico; una región denominada “*construcción específica*” que es aquella que vincula distintos elementos del fragmento de ADN introducido, por ejemplo la región promotora y el gen; y lo que se denomina “*evento específico*” que es una región que vincula el fragmento introducido con el genoma original de la planta.

El ensayo de PCR puede ser de tipo cualitativo, lo que se conoce como PCR convencional o en tiempo final, o cuantitativo, refiriéndose a la PCR en tiempo real. En el primer caso, se puede estimar el porcentaje de un OGM en una muestra o lote siguiendo una estrategia

de sub-muestreo, como se explicó más arriba, siempre contando con los controles adecuados para el ensayo.

En el caso de la PCR en tiempo real, se obtienen resultados cuantitativos, debido a que se realiza una reacción con características especiales. La técnica de PCR en tiempo Real resulta ser una alternativa a la PCR convencional con la que se obtienen resultados cuantitativos muy precisos del número de copias o la actividad transcripcional de un gen particular en un menor tiempo. La denominación de “tiempo real” se debe a que el ADN amplificado puede ser detectado en línea durante el proceso de PCR y no al final del mismo, como sucede con la PCR convencional. La lectura de los resultados se realiza durante la fase exponencial de la reacción, garantizando así una cuantificación más adecuada y precisa del producto amplificado.

La PCR en tiempo real permite obtener una mayor sensibilidad y especificidad y reduce la posibilidad de contaminación por presencia de productos de PCR ya que no es necesario, una vez terminada la reacción, manipular los productos de amplificación (ver más adelante las consideraciones generales para los ensayos). Entre las desventajas que presenta frente a la PCR convencional se puede señalar su mayor costo, tanto en el equipo como en los reactivos utilizados y la complejidad del diseño de los cebadores y sondas, que en muchos casos resulta más exigente.

La PCR en tiempo real combina el uso de un termociclador, un fluorímetro y un ordenador. El termociclador efectúa la PCR en condiciones donde un fluorocromo excitado por un láser va emitiendo una señal de manera proporcional a la cantidad de ADN que se va generando durante los sucesivos pasos de la reacción. La emisión de la señal fluorescente es enviada al lector de fluorescencia que cuantifica la señal emitida. El ordenador procesa la información y despliega, durante cada ciclo de amplificación, la fluorescencia leída en cada muestra. La señal aparecerá claramente a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración de partida de la secuencia de interés, es decir, la señal es apreciable por el equipo una vez que sobrepasa el límite infe-

rior de detección. A partir de ése momento, la cinética de la reacción debe permitir la acumulación de la señal de manera exponencial en el tiempo. La señal de fluorescencia generada es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado. Existen actualmente distintas metodologías para la detección del producto de amplificación utilizando la PCR en tiempo real. Ellas son las sondas fluorescentes y los agente intercalantes de ADN. Desde hace algunos años, esta metodología ha sido adoptada para realizar los análisis de validez comercial.

### **Nuevas metodologías**

Cada vez son más los eventos transgénicos aprobados para su comercialización. Anteriormente, utilizando “*primers*” para la amplificación de la secuencia promotora denominada 35S, o el terminador NOS, comunes a la mayoría de los eventos, era posible determinar la presencia de ADN transgénico en una muestra. Si no se detectaba la presencia de alguna de esas secuencias en la muestra, se podía inferir que ésta no contenía el 90% de los eventos comerciales. Se prevé que en el futuro, existirán gran diversidad de secuencias a determinar (debido a nuevos genes introducidos) y que, si las exigencias comerciales de etiquetado continúan, se requerirá de sistemas más sofisticados que permitan detectar varias secuencias a la vez y de manera rápida.

Existe una tecnología, relativamente nueva, denominada de microchips o microarrays o micromatrices, que podría permitir detectar y cuantificar en un solo ensayo la presencia de cientos o miles de secuencias. A grandes rasgos, una micromatriz es un pequeño soporte sólido del tamaño de un cubre objetos de los utilizados en microscopía óptica, en el cual se han fijado puntos ordenados y microscópicos de secuencias de ADN de simple cadena conocidas. Estas secuencias tienen la capacidad de pegarse (hibridar) con un ADN que le sea complementario, y que estará marcado con una molécula fluorescente. Si existen secuencias complementarias, ocurrirá la hibridación y el punto de la micromatriz quedará marcado. Para poder realizar la observación de este pequeño punto, un aparato de barrido especial

realizará la lectura, identificando los puntos marcados y por lo tanto las secuencias que estén presentes en la muestra bajo análisis.

La ventaja que presentan las micromatrices es que posibilita la detección simultánea de decenas de miles de secuencias de ADN distintas. Entre los inconvenientes que se presentan se puede señalar los costos elevados, la falta de referencias adecuadas para la validación del método, la complejidad sobre los criterios a utilizar para la interpretación estadística de los datos obtenidos así como las dificultades para obtener resultados cuantitativos sensibles y reproducibles para los niveles exigidos en la actualidad para la detección de OGMs.

Actualmente se encuentra en el mercado un sistema para detección simultánea de eventos transgénicos que se basa en una PCR en tiempo final. Es el denominado GMO Dualchip que contiene 14 genes y 20 controles en triplicado. Para más información se puede consultar [www.coextra.eu/researchlive/reportage\\_1120.html](http://www.coextra.eu/researchlive/reportage_1120.html).

### **Valoración comparativa de los distintos métodos de análisis**

Ver Tabla comparativa (tabla 1).

### **Consideraciones generales sobre los ensayos**

#### **Falsos Negativos**

Se define como “falsos negativos” a aquellas reacciones para las que NO se detecta proteína o secuencia de ADN, cuando en realidad sí la contienen. Estos resultados pueden darse por diversas razones: la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción que se está llevando a cabo; ADN o proteínas degradados por diversos motivos (por ejemplo, tratamientos y tiempos excesivos previo al envío de la muestra al laboratorio, por tratamientos de preparación de la muestra en el laboratorio); tamaño de la muestra inferior al requerido para el análisis; incorrecta elección del método o de la estrategia de análisis, presencia del analito a detectar por debajo del límite de detección del método. Para la detección de los falsos negativos se utilizan de manera rutinaria distintos controles

**Tabla 1.**

Bioensayo		Determinación de proteínas		PCR tiempo final		PCR tiempo real	
<b>Objetivo del ensayo</b>	Detección de características biológicas o de una respuesta fisiológica	Detección de proteínas. Determinación de la reacción proteína GM-anticuerpo	Detección de secuencias de ADN	Detección de secuencias de ADN	Detección de secuencias de ADN	Detección de secuencias de ADN	Detección de secuencias de ADN
<b>Tipo de resultado</b>	Cualitativo	Semi-cuantitativo (utilizando la estrategia de sub-muestreo) ELISA en placa puede ser cuantitativo	Cualitativo	Semi-cuantitativo (utilizando la estrategia de sub-muestreo)	Cualitativo	Cuantitativo	Cuantitativo
<b>Matriz sobre la que se puede realizar</b>	Semillas, granos, plántulas	Semillas, granos, material verde joven, raíces, alimentos sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento
<b>Ventajas</b>	Para tolerancia a herbicidas (TH). Método sencillo, preciso y económico	Método sencillo y fácil de llevar a cabo. Permite la detección "in situ". No necesita material ni instalaciones sofisticadas. Preciso, exacto y rápido.	Método sensible, exacto y específico. Permite la identificación específica de eventos. Utilización sobre cualquier tipo de matriz sin importar grado de procesamiento. Método rápido	Método sensible, exacto y específico. Permite la identificación específica de eventos. Utilización sobre cualquier tipo de matriz sin importar grado de procesamiento	Método sensible, exacto y específico. Permite la identificación específica de eventos. Utilización sobre cualquier tipo de matriz sin importar grado de procesamiento. Método rápido	Método sensible, exacto y específico. Permite la identificación específica de eventos. Utilización sobre cualquier tipo de matriz sin importar grado de procesamiento. Método rápido	Método sensible, exacto y específico. Permite la identificación específica de eventos. Utilización sobre cualquier tipo de matriz sin importar grado de procesamiento. Método rápido
<b>Desventajas</b>	Demora para la lectura de los resultados (al menos una semana para TH) Para resistencia a insectos: Método costoso y de difícil realización	Necesita una buena expresión de la proteína en la matriz de análisis. Debe conservarse intacta la estructura proteica a detectar. No permite la identificación entre eventos GM distintos que expresen la misma proteína. Problemas para la cuantificación directa (ELISA en placa). No permite la identificación de proteínas similares entre la proteína GM y la convencional	Detección compleja si no se definen adecuadamente el muestreo, la estrategia de detección y los materiales de referencia. Mayor costo en equipos y reactivos	Detección compleja si no se definen adecuadamente el muestreo, la estrategia de detección y los materiales de referencia. Mayor costo en equipos y reactivos. Mayor posibilidad de contaminación. Mayor costo en equipos y reactivos.	Detección compleja si no se definen adecuadamente el muestreo, la estrategia de detección y los materiales de referencia. Mayor costo en equipos y reactivos	Detección compleja si no se definen adecuadamente el muestreo, la estrategia de detección y los materiales de referencia. Mayor costo en equipos y reactivos	Detección compleja si no se definen adecuadamente el muestreo, la estrategia de detección y los materiales de referencia. Mayor costo en equipos y reactivos
<b>Preparación de la muestra</b>	Preparación sencilla	Requiere de pasos previos para la extracción de proteínas. En general son procedimientos sencillos	Requiere de pasos previos para la extracción de ADN. En general son procedimientos de mayor complejidad.	Requiere de pasos previos para la extracción de ADN. En general son procedimientos de mayor complejidad.	Requiere de pasos previos para la extracción de ADN. En general son procedimientos de mayor complejidad.	Requiere de pasos previos para la extracción de ADN. En general son procedimientos de mayor complejidad.	Requiere de pasos previos para la extracción de ADN. En general son procedimientos de mayor complejidad.
<b>Tiempo promedio para obtención de los resultados</b>	Dependiendo del cultivo, entre 7 y 10 días	Horas	Días (2 a 3 días)	Días (2 a 3 días)	Días (2 a 3 días)	Días (1 a 2 días)	Días (1 a 2 días)
<b>Nivel de preparación personal</b>	Requiere manejo mínimo de la técnica.	Requiere mayor capacitación en el caso de ELISA en placa.	Capacitación en técnicas de biología molecular	Capacitación en técnicas de biología molecular	Capacitación en técnicas de biología molecular	Capacitación en técnicas de biología molecular	Capacitación en técnicas de biología molecular
<b>Exigencia para instalaciones</b>	Instalaciones básicas	Laboratorio con instalaciones básicas. Puede realizarse <i>in situ</i> (tiras reactivas) y laboratorios básicos de inmunología (ELISA en placa)	Laboratorio de Biología Molecular	Laboratorio de Biología Molecular	Laboratorio de Biología Molecular	Laboratorio de Biología Molecular	Laboratorio de Biología Molecular
<b>Aplicación del método</b>	En general para determinación de pureza del carácter por organismos de control o la industria semillera.	Determinación de pureza del carácter y presencia adventicia por parte de organismos de control y/o la industria semillera.	Determinación de pureza del carácter y presencia adventicia por parte de organismos de control y/o la industria semillera. Transacciones comerciales.	Determinación de pureza del carácter y presencia adventicia por parte de organismos de control y/o la industria semillera. Transacciones comerciales.	Determinación de pureza del carácter y presencia adventicia por parte de organismos de control y/o la industria semillera. Transacciones comerciales.	Determinación de pureza del carácter y presencia adventicia por parte de organismos de control y/o la industria semillera. Transacciones comerciales.	Determinación de pureza del carácter y presencia adventicia por parte de organismos de control y/o la industria semillera. Transacciones comerciales.
<b>Uso habitual</b>	En semillas (para TH) No se aplica hasta el momento para la característica de resistencia a insectos	Método de screening rápido en semillas, tejidos varios y alimentos sin procesamiento	Transacciones comerciales en todo tipo de matriz	Transacciones comerciales en todo tipo de matriz	Transacciones comerciales en todo tipo de matriz	Transacciones comerciales en todo tipo de matriz	Transacciones comerciales en todo tipo de matriz
<b>Material de referencia a utilizar</b>	Semillas o granos GM y no GM	Material GM y no GM (Granos, semillas y/o tejidos). Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.	Hairmas GM, ADN y plásmidos. Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.	Hairmas GM, ADN y plásmidos. Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.	Hairmas GM, ADN y plásmidos. Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.	Hairmas GM, ADN y plásmidos. Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.	Hairmas GM, ADN y plásmidos. Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.

durante el análisis. Entre estos controles, se encuentran las muestras positivas para la característica a detectar y controles específicos para la detección de sustancias inhibitoras del análisis.

### **Falsos positivos**

Se define como “falsos positivos” a aquellas reacciones para las que se detecta proteína o secuencia de ADN, cuando en realidad NO las contienen. Gran parte de este tipo de resultados no provienen de la muestra original, sino que se deben a la contaminación de la misma por errores de manipuleo. La contaminación puede darse a lo largo de todo el proceso de análisis. Esta puede ser previa al envío de la muestra al laboratorio así como dentro del laboratorio, ya sea durante la preparación de la misma para el análisis como en el momento de su detección específica. La técnica de PCR es muy sensible, por lo tanto niveles ínfimos de contaminación con ADN en una muestra pueden generar un resultado positivo falso. La amplificación repetida del mismo fragmento de ADN (amplicón) va generando cientos de miles de millones de copias dentro del mismo laboratorio y estas copias pueden contaminar las nuevas muestras y los reactivos si no se tienen cuidados especiales. Además, restos de molienda de semillas o granos u otros tejidos vegetales de muestras previas, pueden llevar la contaminación a nuevas muestras. Asimismo, en el caso de la PCR pueden informarse falsos positivos por elección de una estrategia de detección inadecuada. Los casos más comunes se dan cuando se realiza la detección del Promotor 35S en crucíferas o en alimentos que las contengan (por infección con el virus del Mosaico del Coliflor) y en el caso de *Agrobacterium* con la detección del Terminador NOS.

Para la detección de los falsos positivos se utilizan de manera rutinaria controles negativos. Estos controles consisten en muestras que no contienen la característica especial que cada método permite detectar (secuencia de ADN, proteína o directamente la matriz a analizar).

### **Límite de Detección y Límite de Cuantificación**

Se considera como límite de detección a la mínima concentración del analito de interés

presente en la muestra, que puede ser detectado. Este límite varía de acuerdo al método de elección y dentro de cada método, de acuerdo al tipo de muestra analizada.

El límite de cuantificación es la menor concentración del analito de interés presente en la muestra de estudio que puede ser cuantificado con un aceptable nivel de exactitud y precisión.

En ambos casos, dependerá de la matriz sobre la que se realiza el análisis y del método en sí mismo. Es de suma importancia conocer estos límites de manera de aplicar adecuadamente los métodos. El laboratorio deberá entonces validar sus metodologías mediante ensayos de validación y en lo posible mediante pruebas de interlaboratorio.

### **Los materiales de referencia**

Los materiales de referencia son una herramienta fundamental para cualquier análisis. Por un lado, permiten conocer como se comporta el método con una muestra positiva y con una negativa para la característica a detectar, y por otro son fundamentales para la validación del mismo y su comparación con otros laboratorios. Comercialmente se encuentran materiales de referencia disponibles y confiables para distintos eventos y concentraciones. Los más utilizados y difundidos son las harinas o granos GM, las secuencias de ADN y los plásmidos.

En la actualidad no existe un único material de referencia que pueda aplicarse para la detección y/o cuantificación de todos los productos a ser analizados. Ello conduce a que, cuando estén disponibles, éstos deben ser elegidos y utilizados de acuerdo al tipo de matriz que se quiere analizar. No siempre es sencillo establecer cuál es el mejor material de referencia a ser utilizado como control positivo, sobre todo para efectos de cuantificación, ya que el número de copias por genoma haploide varía para cada evento, además de la existencia de variables propias para las matrices de cada muestra. En relación a los controles negativos, se debe asegurar la ausencia de la característica GM por debajo de cierto umbral y con un rango de tolerancia.

La temática de los materiales de referencia presenta una serie de consideraciones, complejidades, problemáticas y usos que exceden

los límites de este capítulo. Es por ello que sólo se hace esta mención a los mismos.

### **Redacción del informe de resultados**

Los resultados de cada ensayo efectuado por el laboratorio, deben ser informados en forma exacta, clara, no ambigua y objetiva. Es necesario que se especifiquen los datos del laboratorio que realizó el ensayo y los datos del cliente, así como también la descripción del método utilizado con sus respectivos límites de detección y cuantificación, cuando corresponda. Además, deben indicarse las condiciones y cantidad de muestra recibida en el laboratorio así como la cantidad utilizada para hacer el análisis, los materiales de referencia utilizados y su resultado (que deben ser según lo esperado), el nivel de confianza de la prueba y cualquier observación o interpretación que se considere necesaria.

La forma correcta de presentar los resultados para análisis de tipo cualitativo debe contener: "*No se detectó*" o en el caso de dar positivo "*Se detectó la presencia de material GM o de la secuencia XX o proteína XX en la muestra al límite de detección de la técnica*". Cuando corresponda, se puede informar el lote a partir del cual se tomó la muestra analizada.

En el caso de resultados para análisis cuantitativos, se informará como "*Menor al límite de detección de la técnica*" (para aquellos resultados donde no se detecte el analito en estudio) y en valor numérico (porcentaje) cuando el resultado sea positivo y no supere el rango de linealidad del método de laboratorio. Siempre deben quedar indicadas en el informe las unidades en las que se expresan los resultados así como los límites de detección, de cuantificación y la incertidumbre para la matriz en estudio.

En el caso de análisis por PCR todavía no existe una única forma de expresar los resultados. Es por ello muy importante para la comprensión de los resultados que cada laboratorio indique claramente las unidades en que informan los mismos. Algunas de estas expresiones refieren a "masa GM/masa total de la matriz", "secuencias de ADN GM /ADN total en la matriz por especie". Para el caso de semillas, ISTA se ha manifestado al respecto (consultar [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org)).

Existen además múltiples consideraciones, ya sean biológicas, de muestreo o del método analítico a tener en cuenta cuando se realiza la cuantificación. Entre ellas señalamos el estado de ploidía de la matriz bajo análisis, el estado de cigosis, el método de detección elegido, el muestreo utilizado y la cantidad de muestra para la realización del análisis así como los materiales de referencia utilizados y la presencia de eventos apilados en la matriz bajo estudio.

### **Consideraciones generales para la infraestructura básica de los laboratorios**

El laboratorio donde se realizan los análisis debe ser un ámbito de trabajo que permita la adecuada realización de los mismos. Para ello se requiere contar con instalaciones y condiciones ambientales que cumplan con los requisitos de confort y con los recursos necesarios para no poner en riesgo al personal que trabaja en el mismo ni la calidad de los análisis realizados. El grado de complejidad de esta infraestructura depende del tipo de análisis en cuestión. Los laboratorios con mayor grado de sofisticación en su infraestructura y condiciones de trabajo son aquellos que utilizan la técnica de PCR.

Debido a la contaminación cruzada que se puede originar, especialmente cuando se realizan ensayos por PCR, es fundamental tener máximos cuidados en el manipuleo de las muestras y de todos los materiales e instrumentos utilizados para realizar los ensayos. En este tipo de laboratorios se requiere de un ámbito de trabajo especialmente diseñado con cuatro áreas separadas para las distintas etapas del análisis y con un flujo unidireccional de la muestra desde el ingreso (zona limpia, donde no hay productos de amplificación) hasta la zona donde se leerá el resultado (zona "sucia").

En el primer cuarto se realiza la preparación -y en aquellos caso que se requiera- molienda de la muestra, en el segundo se realiza la extracción y purificación el ADN, en un tercero se prepara la reacción de PCR y en el último se produce la amplificación (y observación del resultado en el caso de la PCR cuantitativa) y luego la electroforesis. En este último paso, para el método de PCR en tiempo final, se abre

el tubo de reacción y es donde existe mayor posibilidad de “escape” de los productos de amplificación, por lo tanto es el punto de mayor posibilidad de contaminación. Es conveniente que el primer y último cuarto tengan presión negativa (de manera de sacar al exterior la posible fuente de contaminación), mientras que en el de purificación y PCR la presión debe ser positiva (permitiendo el ingreso de aire limpio).

Cada cuarto debe ser limpiado regularmente con hipoclorito de sodio, en lo posible poseer un sistema de luz ultra violeta (UV) para la destrucción del ADN y contar con sus propios elementos de seguridad para el trabajo (guardapolvos, guantes, anteojos protectores), instrumentos y materiales (equipos en general, pipetas, tips). Se recomienda que sólo personal autorizado para el trabajo dentro de cada área ingrese a los laboratorios para minimizar el transporte de productos de amplificación de un cuarto a otro.

### **Los organismos internacionales y la determinación de OGM**

#### **Normas ISO**

La Internacional Standardization Organization (ISO en sus siglas en inglés), a través del Working Group 7 (WG 7) se ha ocupado en los últimos 8 años de la redacción de normas específicas en el tema. Estas se han desarrollado bajo el Acuerdo de Viena donde la Comisión Europea de Normas (CEN) es quien lidera el desarrollo normativo. En la actualidad 5 normas han sido publicadas bajo el Acuerdo y una Especificación Técnica (TS) que sólo fue publicada por ISO. Estas normas son:

Protein Based Methods (ISO 21572 - Publicada en 2004; Modificada en el año 2005 donde el anexo pasó a ser informativo).

Nucleic Acid Extraction (ISO 21571 – Publicada en febrero 2005).

Qualitative Nucleic Acid Based Methods (ISO 21569 - Publicada en julio 2005).

Quantitative Nucleic Acid Based Methods (ISO 21570 - Publicada en noviembre 2005).

General Requirements and Definitions (ISO 24276 - Publicada en febrero 2006).

Acceptability Criteria for Methods (TS – ISO 21098 - Publicada en febrero 2006).

La norma que discute el tema de toma de

muestras propuesta por la CEN, fue rechazada por ISO, dado que manifestó que ya contaba con normas específicas para la toma de muestra para el caso de cereales y oleaginosas. Este documento sólo continuó su estudio dentro de la normativa CEN.

#### **Reglas ISTA**

La Asociación Internacional de Análisis en Semillas (ISTA en sus siglas en inglés) publicó en el año 2006 su estrategia para la determinación de semillas GM. Específicamente manifiesta que, debido a que las técnicas para determinación de transgénicos son tan diversas, y que se espera que continuamente se incorporen nuevos ensayos debido a la aparición de nuevos eventos, no es posible fijar metodologías. Es por ello, que elabora una estrategia de acreditación de laboratorios para la detección de características específicas. La misma se basa en el cumplimiento de una serie de requisitos técnicos, de capacitación, de desempeño y de la gestión por parte de los laboratorios. Más detalles sobre los documentos referidos a este tema se pueden encontrar en [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org).

#### **Consideraciones finales**

El desarrollo y aprobación para la comercialización de los distintos cultivos genéticamente modificados en el mundo ha generado diversas y variadas acciones y reacciones. En el ámbito del comercio mundial se han puesto en marcha distintos procedimientos, legislaciones y protocolos tendientes a conocer y regular su producción y comercialización.

La necesidad de monitorear, identificar y en algunos casos cuantificar la presencia o no de OGMs y sus derivados ha generado el desarrollo y la implementación de distintas herramientas analíticas que permiten la detección de los diferentes cultivos GM y sus derivados. Asimismo, los laboratorios han debido desarrollar, adaptar y validar métodos para poder detectar este tipo de eventos.

Distintos organismos internacionales dedicados a la elaboración de normas se han ocupado del desarrollo de diversos procedimientos con la intención de unificar criterios para la determinación de OGMs. Este desarrollo normativo se

encuentra todavía en discusión, principalmente para el caso de granos y alimentos. Los principales puntos de conflicto se refieren a la toma de muestra y a la expresión de los resultados para las PCR cuantitativas.

La constante aprobación de nuevos eventos en los distintos países plantea el desafío de la continua actualización y el desarrollo de nuevos métodos y sistemas para la determinación de OGMs en semillas granos y alimentos que se dirigen a países con sistemas de control de OGMs

Es de esperar que en el futuro las decisiones que involucren la implementación de sistemas de control de OGMs tengan en cuenta las distintas y múltiples voces y situaciones, aun aquellas que parecen antagónicas. Para ello, será fundamental que las decisiones políticas y los fundamentos científicos trabajen de manera conjunta y coordinada.

### **Lecturas recomendadas**

CONABIA. Definición de eventos.

<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/biotecnologia/respuestas.php>

CONABIA. Eventos aprobados comerciales.

[http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/conabia/bioseguridad\\_agropecuaria2.php#eventos](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/conabia/bioseguridad_agropecuaria2.php#eventos)

ISAAA. [www.ISAAA.org](http://www.isaaa.org).

<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/37/executivesummary/default.html>

ISTA [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org). Herramientas estadísticas para el análisis de semillas.

<http://www.seedtest.org/en/content---1--1143.html>

ISTA [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org). Información referida a análisis de OGM.

[http://www.seedtest.org/en/info\\_platform\\_for\\_gm\\_seed\\_content---1--1195.html](http://www.seedtest.org/en/info_platform_for_gm_seed_content---1--1195.html).

ISTA [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org). Acreditación de Laboratorios que realizan ensayos de determinación de OGM.

[http://www.seedtest.org/en/for\\_specified\\_traits\\_content---1--1184.html](http://www.seedtest.org/en/for_specified_traits_content---1--1184.html)

ISTA [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org). Posición respecto de las unidades de medida.

[http://www.seedtest.org/en/clarification\\_document\\_units\\_content---1--1273.html](http://www.seedtest.org/en/clarification_document_units_content---1--1273.html)

Longo, F, y Castro, IG. 2006. Métodos de Detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en la Cadena Alimentaria. Conceptos básicos para su implementación. Buenos Aires. Editor: Juan Dellacha. 64 páginas.

Tozzini, Alejandro. 2004. Detección de OGM en la cadena agroalimentaria. Parte IX, Capítulo 4. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Editores Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Luis Mroginski, Buenos Aires. Ediciones INTA.

## VI. CAPÍTULO 5

### Manejo integrado de plagas – Programa de Refugios

Viviana Confalonieri; Cecilia Roca

La bioseguridad es uno de los puntos clave que debe ser abordado cuando se introducen organismos genéticamente modificados (OGM) en un ecosistema, así como la perduración en el tiempo del efecto benéfico de estos OGM, particularmente en aquellos casos en los que se han introducido genes de tipo insecticida.

Los cultivos GM con propiedades insecticidas que se encuentran actualmente en el mercado, producen una proteína cristalina (Cry) que proviene de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Estas proteínas son letales para los insectos susceptibles ya que al ser ingeridas degradan las paredes de su tubo digestivo. Este efecto constituye la base de la defensa contra insectos plaga de todos de los OGM comerciales que se cultivan de la actualidad, reduciendo de este modo el uso de insecticidas químicos, lo que se traduce en beneficios tanto económicos como para la salud y el medio ambiente.

Los organismos Bt fueron cultivados por primera vez a gran escala en 1996, gracias al aval de la “Environmental Protection Agency” (EPA) que permitió su uso comercial. En el año 2007, casi 42 millones de hectáreas en todo el mundo presentaban estos cultivos, con una cantidad acumulativa de más de 200 millones desde 1996. Aunque en la actualidad existe una gran diversidad de toxinas Bt, durante la primera década se cultivaron casi exclusivamente algodón y maíces transgénicos para las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab, respectivamente. Estas toxinas matan alguna de las más importantes plagas de lepidópteros.

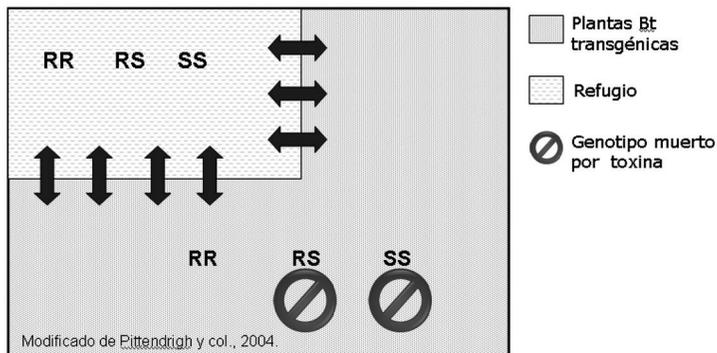
El aval dado por la EPA en 1996 fue considerado por muchos científicos y ambientalistas como muy prematuro. La mayor preocupación era que se carecía de información sobre la forma de evitar que las especies blanco generaran resistencia al carácter introducido, ya que existían evidencias de que éste fenómeno podía ocurrir en el laboratorio. Esto implicaba

no sólo un riesgo en cuanto a la efectividad de los cultivos Bt, sino que también en cuanto a la pérdida de uno de los más exitosos insecticidas microbianos con los que se contaba hasta ese momento. Se consideró necesario entonces crear un programa de “manejo integrado de plagas” específicamente diseñado para el sector agropecuario, que prevenga justamente el aumento de la resistencia en las poblaciones de insectos que se quería atacar.

El programa de manejo más conocido que se aplica en la actualidad es el de “alta dosis + refugio” a través del cual altos niveles de expresión de la toxina en las plantas Bt se asocian a “refugios” o extensiones de campo cultivados con plantas libres de Bt. Este programa se viene aplicando hasta ahora con relativo éxito en plantas transgénicas para una única toxina y se cree que será necesario de aplicar también para los cultivos “dobles Bt”.

La función de los refugios es la de mantener alelos susceptibles en las poblaciones de insectos. Los insectos susceptibles que se desarrollan en gran número sobre plantas no transgénicas se cruzarán con los potenciales insectos resistentes que puedan sobrevivir en las plantas transgénicas. La progenie heterocigota que resulte de estos cruzamientos será eliminada por las altas dosis de proteína insecticida presente en las plantas transgénicas (figura 1). En este sentido, juega un papel importante la dosis de la toxina en las plantas Bt, ya que la dominancia funcional de los resistentes disminuye a medida que aumenta la concentración de la toxina. Si los heterocigotos mueren en las plantas Bt, condición que se cumple a medida que el alelo resistente se hace más recesivo, la resistencia tardará muchas más generaciones en fijarse.

La teoría que subyace a los programas de manejo integrado se basa fundamentalmente en modelos genético-poblacionales. Los modelos son conjuntos de hipótesis sobre cómo se relacionan determinados parámetros en un sistema, y permiten simplificar una realidad en la que interactúan diversos factores de manera compleja. Los parámetros que se incorporan en este caso son poblacionales, tales como las frecuencias iniciales de los alelos de resistencia y los coeficientes de selección asociados a



**Figura 1.** RR, RS y SS genotipos homocigotos resistentes, heterocigotos y homocigotos sensibles a la toxina Bt, respectivamente. Las flechas indican que los insectos pueden circular libremente entre las regiones con plantas transgénicas Bt y con plantas libres de Bt, o refugios.

los distintos fenotipos sensibles y resistentes. De este modo, es posible predecir bajo distintas condiciones ambientales, como será la evolución del carácter en cuestión y estimar valores de fundamental importancia para el sector agropecuario, como lo es el porcentaje mínimo de superficie libre de Bt que se requiere cultivar para evitar que el alelo de resistencia se fije.

El propósito de este capítulo es explicar desde una perspectiva genético-poblacional los fundamentos de estos modelos teóricos y su valor como herramienta predictiva en programas de manejo integrado de plagas. Asimismo, otro objetivo es el de describir los elementos típicos que componen un plan de manejo de resistencia de insectos y por último, presentar un panorama sobre la manera en que estos planes se aplican en Argentina.

### Modelos poblacionales y la evolución del gen de resistencia

Como se mencionó previamente, los modelos son simplificaciones de una realidad que es de por sí compleja. Estas simplificaciones implican supuestos que se deben cumplir si se quiere que el modelo efectivamente refleje esa realidad. En el caso particular que se trata en este capítulo se trabajará con una población de insectos que presenta variabilidad para el carácter "resistencia a la toxina Bt", y se analizará, mediante modelos matemáticos, como evolucionaría ese carácter a través de las ge-

neraciones. El carácter se supone que presenta cierto valor selectivo, el cual varía de acuerdo al microambiente disponible: zona con plantas Bt y zona libre de plantas Bt (refugio). Asimismo, existirían sólo dos alelos para ese carácter, S o alelo de sensibilidad y R, o alelo de resistencia. Se definirá "p" como la frecuencia poblacional del alelo "R" y "q" como la frecuencia del alelo "S".

Otros supuestos serán que:

- las generaciones de insectos no se superponen.
- las poblaciones son de tamaño infinito.
- el apareamiento es al azar.

- no existe migración.
- no existe mutación.
- los coeficientes de selección son similares en ambos sexos.

A continuación se deducirá el cambio en la frecuencia del alelo R luego de una generación de selección, siguiendo el modelo clásico descrito en Hartl y Clark (1989) (tabla 1). En la generación "t" se parte de gametas portadoras del alelo de resistencia R y gametas portadoras del alelo de sensibilidad S, en frecuencias p y q respectivamente. Debido a que existe apareamiento aleatorio, las frecuencias de los zigotos que se formen responderán a las frecuencias del equilibrio de Hardy Weinberg:  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ . Sin embargo, sobre esos zigotos actuará la selección natural (ejercida en este caso particular por los efectos de la toxina Bt) modificando la contribución de adultos a esa generación t + 1 de los genotipos RR, SR y SS en un factor que dependerá del valor adaptativo (W) de cada uno de ellos ( $W_{RR}$ ,  $W_{SR}$  y  $W_{SS}$  respectivamente) (tabla 1). Las frecuencias genotípicas relativas se calculan dividiendo por el valor adaptativo medio de la población ( $W_M$ ) que es igual a:

$$W_M = p^2 W_{RR} + 2pq W_{SR} + q^2 W_{SS} = p (p W_{RR} + q W_{SR}) + q (q W_{SS} + p W_{SR})$$

Las frecuencias de las gametas de cada tipo (p y q) en la generación t + 1 se calculan mediante la fórmula:

**Tabla 1.** Cambio en las frecuencias genotípicas relativas luego de una generación de selección.

Generación	Estadio del ciclo de vida	Frecuencias		
t	Gametas	R		S
	Frecuencia de las gametas	p		q
t + 1	Genotipos	RR	SR	SS
	Frecuencia de los genotipos (zigotos)	p <sup>2</sup>	2pq	q <sup>2</sup>
	Fitness (viabilidad)	W <sub>RR</sub>	W <sub>SR</sub>	W <sub>SS</sub>
	Contribución ponderada (adultos)	p <sup>2</sup> W <sub>RR</sub>	2pq W <sub>SR</sub>	q <sup>2</sup> W <sub>SS</sub>
	Frecuencia relativa de cada genotipo luego de una generación de selección	p <sup>2</sup> W <sub>RR</sub> / W <sub>M</sub>	2pq W <sub>SR</sub> / W <sub>M</sub>	q <sup>2</sup> W <sub>SS</sub> / W <sub>M</sub>

p = frecuencia relativa de homocigotos RR + ½ de la frecuencia relativa de het. SR

q = frecuencia relativa de homocigotos SS + ½ de la frecuencia relativa de het. SR

Reemplazando de acuerdo a la tabla 1, se obtiene:

$$p_{t+1} = (p^2 W_{RR} + \frac{1}{2} 2pq W_{SR}) / W_M = (p (p W_{RR} + q W_{SR})) / W_M$$

$$q_{t+1} = (q^2 W_{SS} + \frac{1}{2} 2pq W_{SR}) / W_M = (q (q W_{SS} + p W_{SR})) / W_M$$

El cambio en la frecuencia génica luego de una generación de selección para el alelo R, Δp, será entonces:

$$\Delta p = p_{t+1} - p_t = ((p (p W_{RR} + q W_{SR})) / W_M) - p$$

que es lo mismo que,

$$\Delta p = \frac{p q (p (W_{RR} - W_{SR}) + q (W_{SR} - W_{SS}))}{W_M} \quad \text{ec.1}$$

De este modo se llega a un modelo poblacional que permitirá estimar cómo será el cambio en la frecuencia del gen de resistencia, el cual dependerá de su frecuencia inicial y de los valores adaptativos de los tres genotipos.

### Estimación de los valores adaptativos

Los valores adaptativos de los homocigotos susceptibles y resistentes serán distintos dependiendo del origen de dichos individuos. El valor adaptativo medio de estos dos genotipos deberá tener en cuenta entonces el porcentaje relativo de refugio y plantas Bt cultivado, como sigue:

$$W_{RR} = \text{ref}(W_{RR/\text{ref}}) + Bt(W_{RR/Bt}) \quad \text{ec.2}$$

$$W_{SS} = \text{ref}(W_{SS/\text{ref}}) + Bt(W_{SS/Bt}) \quad \text{ec.3}$$

donde *ref* y *Bt* (= 1 - *ref*) son las proporciones de hectáreas cultivadas de refugio y plantas Bt, respectivamente; W<sub>RR/ref</sub> y W<sub>RR/Bt</sub> son los valores adaptativos de los individuos RR en el refugio y en los campos con plantas Bt, respectivamente; y W<sub>SS/ref</sub> y W<sub>SS/Bt</sub> son los valores adaptativos de los individuos SS en el refugio y en los campos con plantas Bt, respectivamente.

Si bien existen distintos valores de dominancias funcionales para el alelo resistente, se considerará para todos los cálculos que la resistencia es recesiva. De hecho, las altas

dosis de toxina Bt tienen por objeto llevar a la dominancia funcional del resistente a cero, lo que favorece el retraso en el aumento de la frecuencia de este alelo en las poblaciones. Por lo tanto, se considerará que  $W_{SS} = W_{RS}$ . En Tabashnik y col. (2005) se describe detalladamente cómo calcular empíricamente los costos selectivos, lo cual se lleva a cabo, en términos generales, analizando la supervivencia relativa de las larvas de líneas sensibles y resistentes sobre plantas Bt y libres de Bt, tanto en el campo como en estaciones experimentales.

### Estimación del porcentaje de refugio en condiciones de equilibrio

En genética de poblaciones se denomina "condición de equilibrio" aquella en la que no existe un cambio neto en las frecuencias alélicas de un determinado carácter a través de las generaciones. En el caso particular de los cultivos transgénicos Bt, el objetivo que se quiere lograr es el de llegar a ese equilibrio, manteniendo estable la frecuencia del alelo de resistencia en las poblaciones de insectos, con el fin de que no se diluya el efecto insecticida del Bt. El "programa de refugios", que implica cultivar zonas con plantas libres de Bt junto a los campos con plantas Bt, persigue justamente ese objetivo: el de generar un microambiente en donde los valores selectivos de los individuos sensibles a la toxina Bt sea máximo, asegurando de este modo que el alelo S nunca se pierda. El problema que surge entonces para el productor agrícola es cuál será el porcentaje mínimo que se debe cultivar con plantas libres de Bt para que el programa funcione, ya que es obvio que el rendimiento económico de estas plantas susceptibles de ser atacadas por los lepidópteros será menor.

El porcentaje de refugio necesario para que se alcance la condición de equilibrio se puede deducir de la ecuación 1 (ec.1) como sigue:

$$\Delta p = \frac{p q (p (W_{RR} - W_{SR}) + q (W_{SR} - W_{SS}))}{W_M} = 0$$

por lo tanto en el equilibrio

$$p (W_{RR} - W_{SR}) + q (W_{SR} - W_{SS}) = 0 \quad \text{ec.4}$$

Si se supone que el alelo de resistencia es completamente recesivo, entonces  $W_{SS} = W_{SR}$  por lo tanto el segundo término de la ecuación 4 se anula, y al reemplazar  $W_{SR}$  por  $W_{SS}$  en el primer término, esta ecuación se reduce a:

$$p (W_{RR} - W_{SS}) = 0 \quad \text{ec.5}$$

Sustituyendo  $W_{RR}$  y  $W_{SS}$  según las ecuaciones 2 y 3 del apartado anterior, se obtiene:

$$p ((ref (W_{RR/ref}) + Bt (W_{RR/Bt})) - (ref (W_{SS/ref}) + Bt (W_{SS/Bt}))) = 0$$

Teniendo en cuenta que  $p > 0$ , y que el valor selectivo de los individuos homocigotas susceptibles en los campos Bt ( $W_{SS/Bt}$ ) es 0, entonces,

$$ref (W_{RR/ref}) + Bt (W_{RR/Bt}) - ref (W_{SS/ref}) = 0$$

es decir,

$$Bt (W_{RR/Bt}) - ref (W_{SS/ref} - W_{RR/ref}) = 0 \quad \text{ec.6}$$

La resistencia se mantendrá estable, entonces, cuando el efecto neto de la selección para resistencia que favorece a los RR en los campos Bt sea igual al efecto neto de los costos de selección en contra de ese mismo genotipo en los refugios. La frecuencia de la resistencia disminuirá si aumenta el porcentaje de refugio, disminuye el valor selectivo de los resistentes en campos libres de Bt, y aumenta la desventaja de los resistentes en los campos Bt en relación a los campos libres de Bt.

Por lo tanto, el porcentaje de refugio adecuado para que el alelo de resistencia se mantenga estable se puede estimar mediante la ecuación 6 siempre y cuando se conozcan los distintos valores selectivos. Por ejemplo, en un estudio realizado en campos de algodón de Arizona entre los años 1997 y 2004, Tabashnik y col. (2005) estimaron que, de acuerdo a valores selectivos empíricos medios de los RR en los refugios, y en los campos Bt de esa región, la frecuencia del alelo de resistencia se

mantendrá estable con valores de porcentaje de refugios que rondan el 23%. Sin embargo, este valor obtenido de tamaño de refugio para el equilibrio, que como veremos mas adelante es un valor relativamente bajo en comparación a los que se consideran en la práctica valores efectivos de tamaños de refugios, se basó en estimas de valores selectivos de los individuos resistentes en los campos Bt ( $W_{RR/Bt}$ ) que también fueron bajos.

### **Modelos teóricos vs. datos reales: ¿funcionan los refugios?**

Un estudio recientemente publicado que recavó información de monitoreo de la evolución de la resistencia en distintos países de todo el mundo, demostró que la estrategia de los refugios es en general efectiva y que los modelos teóricos son herramienta útiles para predecir dicha evolución bajo distintos escenarios. El estudio se basó en resultados previos de análisis de la resistencia a Bt en campos de Australia, China, Japón, España y Estados Unidos, de seis de las principales plagas de insectos: *Helicoverpa armigera*, *H. zea*, *Heliothis virescens*, *Ostrina nubilalis*, *Pectinophora gossypiella* y *Sesamia nonagrioides*. Sólo en *Helicoverpa zea* se observó evolución para la resistencia, medida mediante bioensayos, los que demostraron un aumento en la concentración media letal ( $LC_{50}$ ) de toxina Bt Cry 1Ac para poblaciones coleccionadas en campos cultivados con plantas Bt, en comparación con cepas específicas de laboratorio que nunca habían sido expuestas a una dieta Bt. Cuando se incorporaron los parámetros reales iniciales del monitoreo (frecuencias iniciales, porcentaje de refugio, valores selectivos) a los modelos teóricos, se obtuvieron resultados similares en el cambio esperado teórico en dichas frecuencias que las obtenidas al cabo de unos años de observación, demostrando la efectividad de los modelos para la predicción futura en programas de manejo integrado de plagas.

Los modelos teóricos predicen que *H. zea* evolucionará mas rápido para resistencia que las otras plagas antes mencionadas. De hecho, el aumento en la frecuencia del alelo de resistencia en esta especie fue mayor en Arkansas y Misisipi que en Carolina del Norte, siendo

el porcentaje de refugio para las dos primeras regiones de 39%, y para Carolina del Norte del 82%. Con estos tamaños, *H. zea* fijaría la resistencia en 9 años en Arkansas y Misisipi, y en mucho mas de 20 años en Carolina del Norte. Es evidente entonces que el porcentaje más alto de refugio, está impidiendo que la resistencia evolucione más rápidamente en poblaciones de *H. zea* de Carolina del Norte. Altos porcentajes de refugios también retardaron la evolución de la resistencia de *H. armigera* a Cry1Ac en Australia y China, de *P. gossypiella* en Arizona, y de *S. nonagrioides* en España. En Australia, el tamaño del refugio fue del 70%, en China del 87-95%, en Arizona, del 50% y en España fue de alrededor del 95%. Sin embargo, en estas especies una ventaja adicional con respecto a *H. zea* fue la dominancia funcional ( $h$ ) del gen de resistencia, que en la mayoría de ellas es completamente recesivo ( $h=0$ ) y en *H. zea* tiene un valor alto ( $h=0,826$ ) favoreciendo la fijación rápida de la resistencia.

Por último, cabe destacar que un estudio reciente de simulación que aplica modelos genético poblacionales como los expuestos aquí, pero que contemplan un mayor número de parámetros en el cálculo de los valores adaptativos (por ejemplo la reducción en la tasa de mortalidad de los genotipos sensibles a medida que aumenta la edad de la planta y disminuye la expresión de la toxina, o la mortalidad inducida por insecticidas químicos fumigados en la zona de refugios) demuestra de manera teórica que los refugios siguen siendo esenciales incluso en el caso de cultivos de algodón que expresan dos toxinas. Estos cultivos “dobles Bt” se comenzaron a comercializar hace relativamente poco tiempo, por lo que faltan algunos años para poner a prueba mediante datos de monitoreo a campo estas simulaciones teóricas y demostrar, una vez mas la efectividad real de los refugios.

### **Elementos típicos de un plan de manejo de resistencia**

El desarrollo de resistencia en las poblaciones de insectos, consecuencia del proceso natural de evolución, surge como adaptación a las prácticas de manejo y por ende no se limita a un sistema particular de cultivo. Los insectos

pueden adaptarse a cualquier práctica de manejo dependiendo de la presión de selección ejercida sobre ellos. Hay numerosos ejemplos de este fenómeno en insectos que han desarrollado mecanismos de defensa fisiológicos, de comportamiento y metabólicos frente a insecticidas químicos, agentes de control biológico y controles culturales.

En el caso particular de la tecnología Bt la presencia de la proteína durante todo el período de crecimiento del cultivo, aumenta la presión de selección y hace necesaria la incorporación de refugios para el manejo de resistencia de insectos (IRM) y como parte integrada del método de manejo de plagas. En todos los países donde esta tecnología se encuentra disponible se han desarrollado programas de manejo de resistencia de insectos. Estos programas son desarrollados en forma local y en colaboración entre los sectores académicos y de investigación, los gobiernos y la industria, sobre bases científicas y analizando la situación local en cuanto a plagas presentes y el ambiente agroecológico.

Los elementos típicos de un plan de manejo de resistencia incluyen:

**1) Investigación.** Las características de los refugios están dadas por su tamaño (porcentaje sobre el total del área sembrada con maíz), distancia entre ellos y forma. Si bien generalmente en todos los países se utilizan recomendaciones similares que garantizan ampliamente un correcto manejo de resistencia de insectos, las características de los refugios estarán dadas entre otras cosas por las plagas objetivo presentes, por lo tanto los programas se sustentan sobre ensayos que permiten ampliar las herramientas disponibles para evaluar las recomendaciones de IRM dadas al productor.

**2) Comunicación.** Debido al papel clave del conocimiento del productor en el logro de un manejo exitoso y responsable de los maíces Bt, la comunicación es uno de los pilares de los programas de IRM. Los materiales educativos, la difusión en los medios especializados y la capacitación directa a los productores son algunas de las herramientas más utilizadas para lograrlo. Por otra parte es importante el

diagnóstico de la situación con respecto a la adopción de los refugios, no sólo para medir la aplicación real de la práctica, sino también como herramienta para ajustar la estrategia de comunicación dirigida al productor. Las encuestas periódicas son una herramienta utilizada en muchos países para estas mediciones.

**3) Monitoreo.** El objetivo del monitoreo es detectar y confirmar cualquier posible desarrollo de resistencia con la suficiente antelación como para implementar medidas de remediación que permitan retrasar o prevenir la difusión de la resistencia y evitar que se pierda la capacidad de control de los maíces Bt. La herramienta apropiada para monitorear la resistencia a campo depende del patrón de evolución de la resistencia. El patrón espacial de evolución de la resistencia en el campo puede surgir en un foco localizado que evoluciona rápidamente y se expande, o a partir de una población donde la resistencia está dispersa y evoluciona lentamente con un incremento más gradual en la frecuencia de alelos resistentes. Es improbable que el muestreo al azar de la población permita detectar resistencia localizada, a menos que se lleve a cabo a una escala impracticable. En estos casos es mejor utilizar como herramienta de monitoreo la identificación de lotes del cultivo con daños no esperados en las plantas. Para esto es fundamental que los productores estén capacitados para informar a la empresa proveedora de semilla la presencia de plantas del lote con daños de larvas. Una vez detectado e informado el daño no esperado, se deberá confirmar que la planta es una planta Bt, que se esté expresando en sus tejidos el nivel de proteína esperado y que el daño no haya sido producido por otra especie no susceptible al maíz Bt o por cuestiones climáticas. Por otra parte, si la resistencia evoluciona lentamente a partir de áreas dispersas, los daños no esperados sólo podrán ser detectados cuando una gran proporción de la población se haya vuelto resistente. En este caso, la herramienta de monitoreo apropiada es el muestreo al azar de la población y el análisis en laboratorio para detectar frecuencias relativamente bajas de alelos de resistencia.

**4) Remediación.** En caso de confirmarse la aparición de resistencia, deberá aplicarse un plan de remediación que permita reducir la fre-

cuencia de insectos resistentes. Cuando la resistencia se detecta a través de la aparición de plantas con daños no esperados en el cultivo, es esperable que la proporción de resistencia en la población de insectos sea significativa. En este caso las acciones a tomar podrán incluir la aplicación de insecticidas químicos para reducir la frecuencia de insectos resistentes e incluso la suspensión de la aplicación de cultivos Bt en la zona afectada. Por el contrario, si a través de un programa de monitoreo al azar y del análisis en laboratorio se detectara la presencia de alelos de resistencia en una población de insectos, pero la resistencia no se hubiera manifestado aún a campo, se podrían tomar otras medidas para caracterizar la resistencia y, de ser necesario, disminuir su dispersión. Estas medidas podrían incluir la confirmación de la heredabilidad de la resistencia, determinar si la resistencia es recesiva o dominante, su frecuencia, etc.

### El manejo de la resistencia a insectos en Argentina

En Argentina, el Programa de Manejo de Resistencia de Insectos (MRI) en maíz Bt aprobado por la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) en 1999, es llevado a cabo por la Asociación de Semilleros Argentinos (ASA) entidad que nuclea a todas las empresas que comercializan maíz Bt en el país. El objetivo del programa es promover un uso responsable de la tecnología,

que permita retrasar cualquier potencial desarrollo de resistencia y detectar inmediatamente cualquier cambio en la susceptibilidad de la población de insectos.

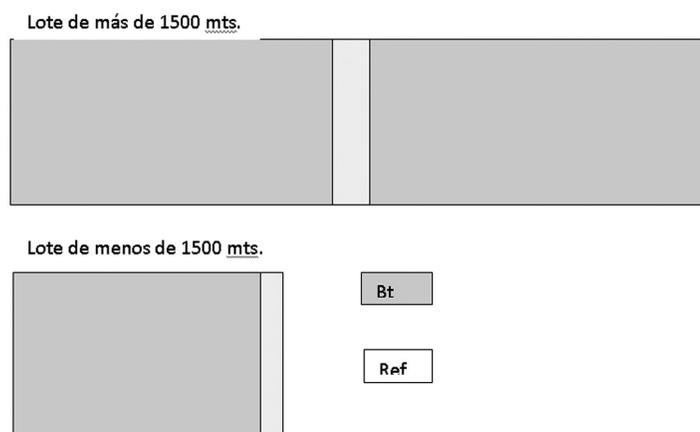
Para cumplir con el objetivo propuesto, ASA financia estudios locales realizados por del INTA, la Estación Agro Industrial Obispo Colombres, y profesionales de laboratorios privados, que permiten ampliar la comprensión de la bioecología de las plagas objetivo y contar con herramientas para monitorear su susceptibilidad a las proteínas Bt actualmente en el mercado.

Con respecto a la comunicación hacia el productor y a la difusión del manejo adecuado de la tecnología Bt, ASA hace especial hincapié en la difusión de un mensaje unificado entre todas las empresas quienes se encuentran activamente comprometidas con el programa, como sigue:

Los refugios deben sembrarse con un maíz no Bt de ciclo similar en la misma fecha de siembra que el lote Bt.

El refugio debe ser el 10% de la superficie del lote. Por ejemplo, cada 9 hectáreas sembradas con maíz Bt, debemos sembrar 1 hectárea con maíz no Bt.

Los refugios deben sembrarse en bloque en uno de los bordes del lote. Si el lote mide más de 1500 m de lado, el bloque de refugio deberá sembrarse en el centro del mismo, para asegurar que los insectos del refugio puedan volar y cruzarse con cualquier potencial sobreviviente del maíz Bt. (figura 2).



**Figura 2:** Distribución del refugio en el lote de acuerdo a las dimensiones del mismo. Bt= zona sembrada con maíz Bt. Ref.= zona de refugio.

Tratamientos químicos: a) No deben realizarse aplicaciones de insecticidas para el control del barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*) en los refugios. b) En caso de detectarse ataque de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) por encima del umbral de acción, pueden aplicarse insecticidas. El mejor control del gusano cogollero se obtiene con aplicación de insecticidas en los primeros estadios del cultivo. De esta forma, además de facilitarse el trabajo, se disminuye la presión de la plaga en estadios más avanzados, preservando la función del refugio.

## Lecturas recomendadas

- ABSTC 2003. Industry Advisory Panel to Agricultural Biotechnology Stewardship Technical Committee (ABSTC) on Monitoring for Insect Resistance to Bt corn report.
- ASA. Programa de Manejo de Resistencia de Insectos. [www.asa.org.ar](http://www.asa.org.ar)
- Carrière, Y., Ellers-Kirk, C., Biggs, R., Degain, B., Holley, D., Yafuso, C., Evans, P., Dennehy, T.J. and Tabashnik, B.E. 2005. Effects of cotton cultivar on fitness costs associated with resistance of pink bollworm (Lepidoptera, Gelechiidae) to Bt cotton. *Journal of Economic Entomology*, 98, 947-954.
- Carrière, Y., Ellers-Kirk, C., Sisterson, M., Antilla, L., Whitlow, M., Dennehy, T.J. and Tabashnik, B.E. 2003. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 100, 1519-1523.
- Cattaneo M., Yafuso, C., Schmidt, C., Huang, C., Rahman, M., Olson, C., Ellers-Kirk, C., Orr, B.J., Marsh, S.E., Antilla, L., Dutilleul, P. and Carrière, Y. 2006. Farm-scale evaluation of transgenic cotton impacts on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 103, 7571-7576.
- Downes S., Mahon R. and Olsen K. 2007. Monitoring and adaptive resistance management in Australia for *Bt*-cotton: current status and future challenges. *J. Invertebr. Pathol.*, 95, 208-213.
- Farinós, G.P., de la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. and Castañera, P. 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomologia Experimentata et Applicata*, 110, 23-30.
- Gould, F., 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 701-726.
- Gustafson, D.I., Head, G.P. and Caprio, M.A. 2006. Modeling the impact of alternative hosts on *Helicoverpa zea* adaptation to Bollgard cotton. *J. Econ. Entomol.* 99, 2116-2024.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer, Sunderland, MA, 2nd ed.
- James, C. 2007. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2007. *ISAAA Briefs* No. 37. Ithaca, NY, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Meredia K. M. 1994. "Sustaining Host Plant Resistance Derived Through Conventional and Biotechnological Means" *Insect Resistant Maize. Proceedings of an International Symposium held at CIMMYT.*
- Nibouche S., Guérard N., Martin P., Vaissayre M. 2007. Modelling the role of refuges for sustainable management of dual-gene Bt in West African smallholder farming systems. *Crop Protection*, 26, 828-836.
- Pittendrigh B.R., Gaffney P.J., Huesing J.E., Onstad D.W., Roush R.T., Murdock L.L. 2004. 'Active' refuges can inhibit the evolution of resistance in insects towards transgenic insect-resistant plants. *Journal of Theoretical Biology*, 231, 461-474.
- Roush R.T. 1997. Managing resistance to transgenic crops. In: N. Carozzi and M. Koziel (ed.) *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Taylor and Francis, London. pp. 271-274.
- Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62, 775-806.
- Shelton, A.M., Zhao, J.-Z. and Roush, R.T. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology*, 47, 845-881.
- Tabashnik B.E. and Carriere, Y. 2008. Insect resistance to genetically modified crops. In: A.M.R. Gatehouse and N. Ferry (ed.) *Environmental Impact of Genetically Modified Crops*. CABI, Wallingford, UK.
- Tabashnik B.E., Dennehy, T.J. and Carriere, Y. 2005. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 15389-15393.
- Tabashnik B.E., Gassmann A.J., Crowder D.W. and Carriere, Y. 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Technology*, 26, 199-202.
- Tabashnik B.E., Gould, F., Carriere, Y., 2004. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. *J. Evol. Biol.*, 17, 904-912.
- Tabashnik BE. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39, 47-79.

## VI. CAPÍTULO 6

### Resistencia de malezas a herbicidas: evolución y estrategias de manejo

Daniel Tuesca; Luisa Nisensohn;  
Mario R Sabbatini; Guillermo Chantre

#### Introducción

En los agroecosistemas la presencia de malezas interfiere dificultando las tareas de siembra y cosecha y generando pérdidas de rendimiento por competencia con los cultivos. La magnitud de estas pérdidas varía en función de la interacción de numerosos factores tales como la composición de la comunidad de malezas, la abundancia relativa de cada una de las especies que la integran, las condiciones ambientales, la modalidad de conducción del cultivo, entre otros. Los niveles de pérdida causados por las malezas pueden oscilar entre 0 y 30% para especies poco agresivas con bajos niveles de infestación hasta un 80% para malezas más competitivas, en densidades muy altas y frecuentemente coexistiendo con el cultivo durante todo su ciclo.

La reducción del grado de abundancia de las poblaciones de malezas que acompañan los cultivos puede efectuarse mediante el control mecánico, empleando diversas herramientas de labranza; el control biológico, que utiliza agentes biocontroladores (fundamentalmente insectos y hongos) que afectan malezas específicas; el control cultural, donde se aprovechan las características propias de los cultivos que integran la secuencia, y el control químico, que involucra el empleo de herbicidas. Actualmente, el control mecánico tiene una utilidad limitada debido a la adopción masiva de sistemas con labranza mínima o directamente sin labranza (siembra directa). El control biológico, si bien es una metodología de manejo de plagas altamente recomendado por su bajo impacto ambiental, se encuentra limitado a aquellas especies de malezas de las cuales se han aislado y autorizado el uso de agentes biocontroladores. El control cultural, utilizado por los agricultores desde el inicio mismo de la agricultura, ha recibido en los últimos años una

especial atención, por constituir una alternativa ante el uso excesivo de herbicidas. Una de las opciones más conocidas y aplicadas es la rotación de cultivos con diferente ciclo y hábito de crecimiento, la elección de cultivares competitivos, la modificación de la fecha de siembra y el acortamiento de la distancia entre surcos a los fines de aumentar la habilidad competitiva de los cultivos frente a las malezas.

En las últimas décadas el enfoque alternativo más utilizado para solucionar el problema de las malezas consistió en el control químico utilizando herbicidas. Una de las razones de este predominio radica en la relativa simplicidad de la tecnología, que permite su empleo aún con conocimientos escasos de los fundamentos en que se sustenta. La elección de estrategias de reducción o de erradicación de malezas en reemplazo de estrategias de prevención y contención se vio favorecida no sólo por factores tecnológicos, como la eficacia de los principios activos y la tecnología de aplicación, sino también por factores económicos y socio-culturales como la disminución de los costos relativos, el aumento de la escala productiva y las características de los actores involucrados en el proceso de producción. A pesar de la continua generación y sustitución de diversos herbicidas en las últimas dos décadas no fue posible erradicar a las malezas sino que por el contrario se seleccionaron biotipos tolerantes y/o resistentes a algunos principios activos. La resistencia de diferentes biotipos de insectos a diversos plaguicidas es el mayor desafío del control de plagas desde hace medio siglo en todo el mundo. En los últimos años, este mismo desafío se ha trasladado al control de malezas, fundamentalmente en aquellos cultivos en los que se aplican intensamente herbicidas.

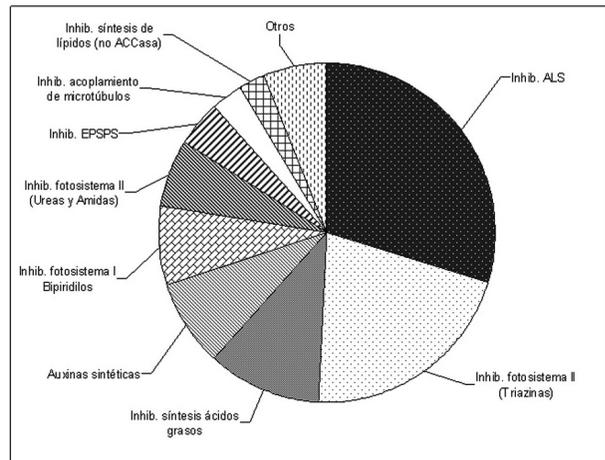
En el manejo de malezas en cultivos se han diferenciado dos conceptos que se relacionan con la capacidad que tienen algunas plantas de sobrevivir a los tratamientos con herbicidas. Así, el término tolerancia se emplea para definir la capacidad natural heredable de una especie para sobrevivir y reproducirse luego de un tratamiento herbicida, mientras que la resistencia a herbicidas se define como la capacidad heredable de una población o biotipo para sobrevivir y reproducirse después de la aplicación

de una dosis de herbicida que era letal para la población original. Desde la aparición de los primeros herbicidas selectivos en el mercado argentino en los años 60', los agricultores han lidiado con el problema de la tolerancia. Así por ejemplo, varias especies de malezas son tolerantes al 2,4-D y a la atrazina, dos herbicidas selectivos ampliamente utilizados desde hace muchos años en los cultivos de trigo y maíz, respectivamente. Para controlar esas malezas tolerantes se utilizan otros herbicidas o se emplean diferentes métodos de control. En cambio, la resistencia es un fenómeno relativamente nuevo, y si bien en nuestro país se ha manifestado en unas pocas especies, está generando una creciente preocupación en los agricultores.

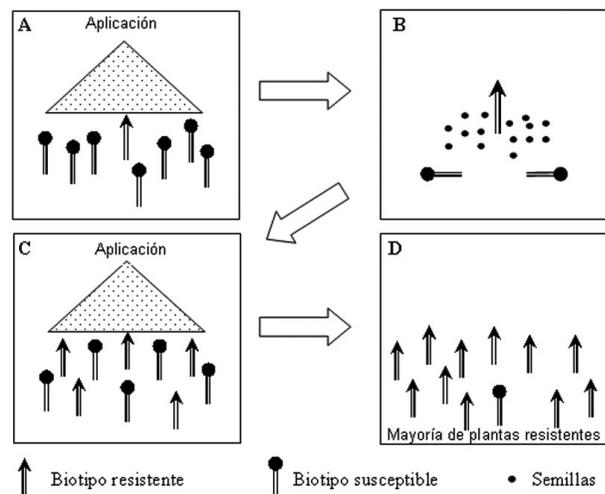
### Desarrollo de resistencia en poblaciones de malezas

El primer registro de resistencia a herbicidas se reportó en 1970 en Estados Unidos, en una población de *Senecio vulgaris* (senecio) que mostró resistencia a simazina y atrazina luego de un período de diez años en el que estos principios activos se aplicaban una o dos veces por año. A nivel mundial, la tasa de aparición de biotipos resistentes se ha incrementado notablemente. En 1983 se habían detectado 60 casos de resistencia y en la actualidad se registran 321 biotipos resistentes que corresponden a 185 especies, de las cuales 111 son dicotiledóneas y 74 son gramíneas. Si bien se ha documentado resistencia a la mayoría de los grupos químicos, un alto porcentaje de los casos corresponden a inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS), de los fotosistemas I y II, de la síntesis de ácidos grasos y de las auxinas sintéticas (figura 1).

En las poblaciones de malezas, el desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo en respuesta a la presión de selección ejercida por el uso repetido de herbicidas con el mismo sitio de acción. Los biotipos susceptibles mueren, mientras que los resistentes sobreviven y producen semillas. Si continúa la aplicación de herbicidas que actúan sobre el mismo sitio de acción, la proporción del biotipo resistente se incrementa en relación al biotipo susceptible (figura 2).



**Figura 1.** Distribución de los casos registrados de resistencia en función de los distintos grupos de herbicidas.



**Figura 2.** Evolución de la resistencia. (A) una población de malezas que presenta mayoría de plantas susceptibles es pulverizada con un herbicida. Como el biotipo resistente al herbicida se encuentra en una frecuencia muy baja, la población en general es eficientemente controlada. (B) Con la aplicación recurrente del mismo herbicida (u otros herbicidas que actúan en el mismo sitio de acción) las plantas susceptibles son eliminadas antes de formar semillas que garantizan su supervivencia. Contrariamente, la frecuencia del biotipo resistente se incrementa ya que dispersan sus semillas normalmente. (C) Al persistir la aplicación de estos herbicidas, la densidad del biotipo resistente se incrementa significativamente. (D) Luego de algunos años la mayoría de los individuos de la población es resistente y el herbicida ya no resulta una herramienta eficiente para el control de la maleza.

La detección de biotipos resistentes no es inmediata; este proceso sólo comienza a percibirse cuando los individuos resistentes representan aproximadamente el 30% de la población. Uno de los requisitos para la evolución de resistencia en las poblaciones de malezas es la presencia de variación genética heredable para la resistencia. Así, en poblaciones no seleccionadas se pueden distinguir dos situaciones:

1. La población no posee alelos que confieren resistencia al herbicida cuando se inicia el proceso de selección. En este caso la probabilidad de que la población adquiera resistencia a través de mutación, dependerá de i) la frecuencia de mutación, ii) las desventajas selectivas de los alelos o genes que confieren resistencia en un ambiente sin selección y iii) el tamaño de la población.

2. Preexistencia de genes resistentes. En este caso los alelos que confieren resistencia están presentes en la población antes de aplicarse el herbicida, aunque en una frecuencia muy baja para ser detectados. En esta situación, la evolución de la resistencia será más rápida que en 1.

### **Mecanismos de resistencia**

Existen tres mecanismos por los cuales se anula la actividad fitotóxica del herbicida dentro de la planta y se genera resistencia:

**Modificación del sitio de acción.** Se producen cambios estructurales en la molécula que constituye el sitio de acción del herbicida. De esta manera, el herbicida no puede unirse a dicha molécula y se inhibe el efecto fitotóxico (ej.: resistencia a las triazinas o a los inhibidores de ALS).

**Detoxificación por metabolización.** Se producen cambios en la tasa de detoxificación del herbicida. En una planta resistente, el herbicida se degrada a metabolitos no fitotóxicos en forma más rápida que en una planta susceptible (ej.: algunos casos de resistencia a los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos).

**Reducida absorción, transporte o secuestro.** El secuestro o aislamiento implica que el herbicida sea apartado de las regiones metabólicamente activas de la célula vegetal, y trasladado a sitios menos activos (por ejemplo, una vacuola) donde es inocuo para el cre-

cimiento vegetal. Este paso frecuentemente es precedido por una desactivación por conjugación con otra molécula (por ejemplo, un azúcar). Se produce de este modo una reducción de la concentración del herbicida en el sitio de acción. Este mecanismo ha sido sugerido en algunos casos de resistencia a los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos y del fotosistema I.

### **Factores que modifican la tasa de evolución de la resistencia**

En las poblaciones de malezas existen diferentes factores que influyen en los procesos evolutivos y que interactúan para determinar tanto la probabilidad como la velocidad a la que puede ocurrir la resistencia. Estos factores están relacionados con características de las poblaciones de malezas, de los herbicidas y de los sistemas de manejo del agroecosistema.

#### **1 Factores relacionados con la biología y genética de las poblaciones de malezas:**

**1.a. Frecuencia de alelos resistentes.** A medida que dicha frecuencia aumenta en una población, la tasa de evolución de la resistencia será mayor.

**1.b. El modo de herencia de la resistencia.** Si la resistencia es conferida por alelos dominantes la evolución será más rápida, debido a que tanto los individuos homocigotas como heterocigotas resultarán resistentes.

**1.c. Número de genes que confieren resistencia.** La herencia de la resistencia es comúnmente monogénica, es decir que está controlada por un solo gen, dando lugar a tasas de evolución relativamente elevadas. Por el contrario, cuando la resistencia es poligénica y está asociada con varios genes, la evolución es más lenta, ya que se requieren recombinaciones genéticas durante varias generaciones para reunir un número suficiente de alelos que den lugar a un genotipo resistente.

**1.d. Características reproductivas de la especie.** En las especies alógamas, los alelos de resistencia pueden dispersarse no sólo a través de las semillas, sino también mediante el polen transportado por el viento o por insectos. En las especies autóгамas el flujo génico es sumamente reducido entre individuos, y en

este caso la dispersión de alelos resistentes se produce casi exclusivamente a través de semillas.

**1.e. Capacidad reproductiva de la maleza.** La producción de un elevado número de semillas favorece la dispersión de la resistencia.

**1.f. Tamaño de la población de malezas.** En poblaciones de malezas con densidades elevadas, la probabilidad de que algunos individuos resistentes estén presentes será mayor.

**1.g. Longevidad de las semillas en el suelo.** En las especies que poseen un banco de semillas persistente, sólo una fracción de éste estará expuesto a la selección por el herbicida en cada estación de crecimiento. Así, en años sucesivos las poblaciones de plántulas reclutadas a partir del banco incluirán una proporción de individuos susceptibles. Esto resultará en una disminución de la frecuencia de alelos resistentes y hará más lenta la evolución de la resistencia.

**1.h. Mecanismos de dispersión de semillas.** En el caso de especies anemófilas, el viento puede dispersar semillas de genotipos resistentes a áreas no infestadas. La dispersión por efecto antrópico también debe tenerse en cuenta, ya que la maquinaria es una vía de transporte de estos genotipos hacia áreas libres de individuos resistentes.

**1.i. Período de emergencia.** En la medida en que las poblaciones de malezas tengan períodos prolongados de germinación, la probabilidad de que el herbicida afecte sólo a una parte de dicha población se incrementa. Los individuos susceptibles que emerjan con posterioridad a la aplicación contribuirán a disminuir la frecuencia de alelos resistentes y la evolución de la resistencia será más lenta.

**1.j. El valor adaptativo (*fitness*) relativo de los genotipos resistentes y susceptibles.** El valor adaptativo de un genotipo se mide a través del éxito reproductivo, es decir la cantidad de descendientes que están presentes en la siguiente generación. En poblaciones que se aparean al azar casi todos los alelos de la población van a estar en forma heterocigota durante los primeros estadios de la evolución de la resistencia. En el caso que frente a las aplicaciones de herbicidas, los individuos heterocigotas (RS) tengan más *fitness* que los homocigotas sus-

ceptibles (SS), la evolución de la resistencia será rápida. Si en cambio, los heterocigotas poseen un *fitness* similar al de los susceptibles, la resistencia evolucionará más lentamente. En algunos casos, el genotipo resistente tiene un valor adaptativo menor que el susceptible, en esta situación si se reduce la presión de selección, por ejemplo, utilizando herbicidas con distinto sitio de acción, la frecuencia del genotipo resistente disminuye rápidamente en la población.

## **2 Factores relacionados con el herbicida**

**2.a. Dosis empleadas.** Cuando la resistencia es monogénica, el empleo de dosis elevadas aumenta la presión de selección y favorece la evolución de la resistencia. Por el contrario, la utilización de sub-dosis, al disminuir la presión de selección, puede atrasar la aparición de la resistencia. En esta situación, las semillas provenientes de plantas susceptibles sobrevivientes al herbicida, contribuirán a que en la siguiente generación disminuya la frecuencia de alelos resistentes en la población total. Si la resistencia es poligénica es necesario que se produzcan recombinaciones entre individuos durante varias generaciones para alcanzar un número suficiente de alelos que generen un genotipo resistente. En este caso, la utilización de sub-dosis de herbicidas permitirá que aquellos individuos que expresan mecanismos de resistencia relativamente débiles por no poseer la cantidad de alelos suficientes sobrevivan y contribuyan al *pool* de genes de resistencia. En cambio, al aplicar dosis altas se elimina la mayoría de la población disminuyendo así la frecuencia de alelos resistentes en la población total.

**2.b. Eficacia.** La eficacia de un herbicida está relacionada con la mortalidad que causa en una población de malezas. Como se indicó en el punto anterior, en caso que la resistencia sea monogénica, los herbicidas más eficaces eliminarán una mayor proporción de individuos susceptibles y de este modo facilitarán la evolución de la resistencia. En cambio, si la resistencia es poligénica, una menor eficacia de los herbicidas podría beneficiar la sobrevivencia de algunos alelos que, por acumulación, incrementarán el *pool* de genes resistentes. Así,

tanto los herbicidas eficaces como ineficaces contribuyen a aumentar, mediante diferentes mecanismos, el desarrollo de la resistencia. La evolución de la resistencia por ello puede demorarse, pero es un proceso inevitable mientras se usen herbicidas como única herramienta del manejo de malezas.

**2.c. Especificidad del sitio de acción.** En el caso de herbicidas que interfieren con un solo sitio de acción, el cambio en un solo gen puede ser suficiente para afectar la unión de la molécula herbicida al sitio de acción. El uso de herbicidas con múltiples sitios de acción tendrá menor probabilidad de generar biotipos resistentes.

**2.d. Residualidad.** Los herbicidas no residuales sólo actúan sobre los individuos de la población ya emergidos. Los herbicidas residuales afectan además a las cohortes que emergerán posteriormente a la aplicación, eliminando así una mayor proporción de individuos susceptibles de la población y favoreciendo la evolución de la resistencia.

**2e. Patrones de uso.** El empleo repetido, dentro de la misma campaña agrícola o en campañas sucesivas del mismo herbicida o de herbicidas con igual sitio de acción favorecerá la evolución de poblaciones resistentes.

### Clasificación de la resistencia

La clasificación de la resistencia se asocia con los mecanismos de resistencia involucrados. Así pueden distinguirse dos tipos de resistencia: cruzada y múltiple.

Resistencia cruzada: se refiere a la resistencia a dos o más herbicidas del mismo o de diferentes grupos químicos provocada por un único mecanismo. Dentro de este tipo se pueden definir dos categorías:

1. Resistencia cruzada asociada con la modificación del sitio de acción. Es el tipo más frecuente de resistencia cruzada y ocurre cuando un cambio en el sitio de acción de un herbicida confiere resistencia a herbicidas que inhiben el mismo sitio de acción. Esta modificación no necesariamente resulta en resistencia a todos los grupos de herbicidas con similar sitio de acción ni a todos los herbicidas dentro de un mismo grupo químico. Es el caso de biotipos de *Amaranthus quitensis* re-

sistentes a sulfonilureas, imidazolinonas y triazolopirimidinas, debido a una alteración de la ALS.

2. Resistencia cruzada no asociada con la modificación del sitio de acción. En este caso, la resistencia a dos o más herbicidas es debida a un mecanismo de resistencia diferente a la modificación del sitio de acción. Los mecanismos potenciales incluyen: reducida absorción y transporte, secuestro y detoxificación del herbicida. Biotipos de *Lolium rigidum* presentan resistencia cruzada a herbicidas del grupo de las triazinas y de las ureas debida a un aumento en la tasa de detoxificación de esos herbicidas.

**Resistencia múltiple:** comprende la resistencia a uno o más herbicidas del mismo o de diferentes grupos químicos debida a dos o más mecanismos. Los casos más simples de resistencia múltiple son aquellos donde un individuo o población posee dos o más mecanismos que le confieren resistencia a un herbicida o grupo de herbicidas. Una situación más compleja es aquella donde la resistencia es a diferentes grupos químicos. Tal es el caso de un biotipo de *Lolium rigidum* en Australia que presenta resistencia a nueve grupos de herbicidas conferida por distintos mecanismos.

### Diagnóstico de malezas resistentes a herbicidas

La detección temprana de la resistencia permite maximizar la efectividad de los programas de manejo y prevenir su dispersión a campos vecinos. Las fallas en el control de malezas no siempre están asociadas con la presencia de biotipos resistentes sino que pueden relacionarse con empleo de dosis de herbicidas inadecuadas, deficiente incorporación del herbicida, incorrecto uso de coadyuvantes y surfactantes, condiciones ambientales desfavorables para la actividad del herbicida, momento inadecuado de aplicación o flujos de emergencia posteriores a la aplicación en el caso de herbicidas poco residuales.

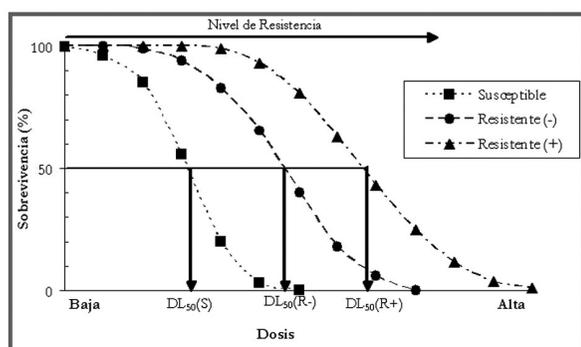
Una vez que estas causas han sido descartadas deben considerarse los siguientes aspectos que caracterizan lotes con poblaciones

de malezas que han desarrollado resistencia:

- La especie sospechosa está inicialmente confinada en pequeños manchones.
- Todas las especies susceptibles al herbicida son bien controladas, excepto la especie sospechosa.
- Se detectan individuos de la especie sospechosa sin síntomas y dispersos entre plantas de la misma especie que han sido controladas.
- La especie sospechosa normalmente es muy susceptible al herbicida empleado.
- Se ha utilizado el mismo herbicida en forma repetida sin emplear otros métodos de control (mecánico o cultural).
- La historia del lote indica un uso extensivo e intensivo a lo largo del tiempo del herbicida aplicado o de herbicidas con el mismo sitio de acción.

### Cuantificación de la resistencia

La resistencia puede ser cuantificada comparando valores experimentales derivados de biotipos resistentes y susceptibles. Por ejemplo, se puede comparar la dosis de herbicida requerida para controlar el 50 % de la población de malezas ( $DL_{50}$ ), la dosis que causa un 50% de reducción en la biomasa ( $GR_{50}$ ) o la dosis que disminuye en un 50% la actividad de una enzima específica ( $I_{50}$ ). La metodología empleada para la estimación de estos valores se basa en la construcción de *curvas de dosis-respuesta*. Los valores de estos índices serán menores en biotipos susceptibles y aumentarán a medida que los biotipos presenten mayor



**Figura 3.** Curvas dosis-respuesta para biotipos con distinto grado de resistencia.

grado de resistencia (figura 3).

Otro indicador utilizado para comparar los diferentes grados de resistencia entre biotipos es el *factor de resistencia* que indica el número de veces que es necesario aumentar la dosis de un herbicida en un biotipo resistente para alcanzar un control similar al obtenido en el biotipo susceptible. Este factor resulta del cociente entre valores de  $DL_{50}$ ,  $GR_{50}$  o  $I_{50}$  del biotipo resistente y los valores de éstos mismos índices del biotipo susceptible.

### Casos de resistencia en Argentina

Hasta el año 2005, el único caso de resistencia documentado en Argentina correspondía a *Amaranthus quitensis* (yuyo colorado) resistente a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) como por ejemplo, imazetapir, clorimurón etil y flumetsulam.

El empleo generalizado de siembra directa y la introducción de cultivares de soja resistentes a glifosato a partir de 1997 produjo importantes modificaciones en las comunidades de malezas. Asociado con algunas características específicas del glifosato, se estimaba una baja probabilidad de que las malezas desarrollaran resistencia a este principio activo; no obstante hasta la fecha se han detectado 15 casos de resistencia a glifosato en distintas especies de malezas a nivel mundial.

El primer caso de resistencia a glifosato en Argentina se confirmó en el año 2005 en biotipos de sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*). Las primeras deficiencias en el control con este herbicida se observaron en las provincias de Salta y Tucumán, en el año 2003 y experimentos realizados posteriormente corroboraron la resistencia a ese principio activo. Investigaciones recientes permiten asegurar que el número de biotipos de sorgo de Alepo resistente a glifosato está aumentando, y el área de distribución de los mismos incluye la región sojera núcleo. En ensayos realizados comparando estos biotipos con otros susceptibles, se determinó un grado relativamente alto de resistencia a glifosato. Resta evaluar si estos biotipos resistentes se han generado en forma independiente o guardan alguna relación con los casos encontrados en el noroeste argentino.

Estudios realizados en el sudoeste de la

Provincia de Buenos Aires indican la existencia de poblaciones de raigrás (*Lolium multiflorum*) con una menor sensibilidad al glifosato, lo cual sugeriría el desarrollo de biotipos resistentes. En poblaciones con un historial de alta frecuencia de aplicación de glifosato se detectaron valores de  $GR_{50}$  entre 3,6 y 4 veces superiores al de poblaciones sin registro de uso de este herbicida. Además, se observaron valores de hasta 20% de supervivencia en individuos de poblaciones tolerantes a dosis de 1440 gr e.a.ha<sup>-1</sup>, mientras que la supervivencia fue nula para los individuos de poblaciones sensibles a una dosis de 360 gr e.a.ha<sup>-1</sup>. Experiencias recientes indicaron valores de supervivencia de hasta 40% a una dosis de 1680 gr e.a.ha<sup>-1</sup> en plántulas obtenidas a partir de semillas cosechadas de una población que sobrevivió a una aplicación comercial de glifosato. Existen casos confirmados de biotipos de raigrás resistentes a glifosato en Chile y Brasil.

El contexto favorable para el mercado internacional de *commodities*, el precio relativamente bajo del glifosato respecto a otros herbicidas y su probada eficacia en un amplio espectro de malezas, redundarán en un creciente aumento del área sembrada con cultivos resistentes a este herbicida. Es necesario implementar medidas de manejo integrado para prevenir el incremento en las poblaciones de malezas tolerantes y resistentes a glifosato.

### **Manejo integrado para prevenir la evolución de la resistencia**

Existen dos estrategias principales para demorar la manifestación de la resistencia utilizando herbicidas:

1. Rotar herbicidas con distintos sitios de acción y no realizar más de dos aplicaciones consecutivas de herbicidas con el mismo sitio de acción en el mismo lote a menos que se incluyan otras prácticas de control efectivas en el manejo del sistema.
2. Emplear mezclas de herbicidas con distintos sitios de acción o aplicar en forma secuencial herbicidas con distintos sitios de acción pero similar espectro de acción sobre las malezas a controlar.

Como ya se indicó anteriormente, el uso del

control químico como única medida de manejo de las malezas puede demorar la aparición de resistencia, pero no erradicarla. Las prácticas conducentes a la erradicación de la resistencia son las del control integrado, que resulta de combinar el control químico con el control mecánico, cultural y/o biológico. Así, resulta aconsejable sumar al uso de herbicidas, algunas de las siguientes prácticas:

- Realizar rotaciones de cultivos con diferentes ciclos de crecimiento. Esta práctica presenta varias ventajas: permitir el uso de herbicidas con diferentes sitios de acción y permite utilizar diferentes fechas de siembra en los distintos cultivos, formas de preparación del suelo y otros métodos culturales para controlar un problema particular de malezas.
- Laboreo antes de la siembra para controlar las plantas nacidas y enterrar semillas no germinadas.
- Retraso de la siembra de manera de controlar los primeros flujos de emergencia de malezas con control mecánico o herbicidas no selectivos.
- Evitar la dispersión de semillas de malezas resistentes. Para ello utilizar herbicidas no selectivos en precosecha de los cultivos antes de la madurez de las semillas de las malezas y limpiar los equipos de labranza y cosecha antes de transportarlos a otros lotes.
- Releva los campos regularmente, identificando las malezas presentes de manera de responder rápidamente a cambios en las poblaciones de malezas para restringir la dispersión de biotipos resistentes que puedan haber sido seleccionados.
- Iniciar programas de control biológico a los fines de identificar biocontroladores que disminuyan los perjuicios ocasionados por las especies de malezas más importantes de la región.

Si bien la combinación de diferentes métodos de control es la estrategia más recomendada para demorar o evitar la evolución de resistencia, un enfoque interdisciplinario de esta problemática surge como esencial para una solución de largo plazo. Un programa de **Manejo Integrado de Malezas** es un sistema de manejo que enfoca el problema de forma

compatible con la preservación de la calidad del ambiente, utilizando diferentes tácticas y estrategias de control con el objeto de reducir la población de malezas a niveles tales que los perjuicios económicos producidos resulten inferiores a un umbral económico aceptable para el sistema general de producción. Este programa puede involucrar, además de los métodos de control ya señalados, estudios básicos de la bioecología de las malezas, medidas preventivas, entrenamiento de personal calificado, extensión a agricultores, entre otros. Un manejo integrado de malezas, en el que múltiples estrategias son implementadas de una manera racional, es la única solución en el marco de un manejo sustentable del sistema productivo.

### Lecturas recomendadas

- Bradshaw L. D., S. R. Padgett S. L. Kimball, and Wells B. H. 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology*, 11:189–198.
- Christoffoleti, P.J. 2008. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 3ª Edição, Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR). Piracicaba, Brasil.
- De Prado, R.; Cubero, S. y Osuna, M.D. 2001. Biotipos resistentes a herbicidas. Distribución mundial. En: *Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI*. Capítulo 22: 279-291. De Prado, R. y Jarrín, J. (Eds). Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Devine, M.D.; Duke, O. y Fedtke, C. 1993. *Physiology of herbicide action*. P.R.T. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- García Torres, L. y Fernández Quintanilla, C. 1991. *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid - Mundi-Prensa, Madrid.
- Hall, L. Beckie, H. y Wolf, T.M. 1999. *How herbicides work. Biology to application*. Alberta Agriculture, Food and Rural Development Publishing Branch. Edmonton, Alberta. Canada.
- Jasieniuk, M., 1995. Constraints on the evolution of glyphosate resistance in weeds. *Resistant Pest Management*, 7: 31-32.
- Kogan, M. y Pérez, A. 2003. *Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Ediciones Universidad Católica e Chile. Santiago, Chile.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santaella, P. and Gauvrit, C. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a Ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science* 55:435-440.
- Powles S.B. y Preston C. 2006. Evolved Glyphosate Resistance in Plants: Biochemical and Genetic Basis of Resistance. *Weed Technology*, 20:282–289.
- Powles, S.B. y Holtum, J.M. 1994. *Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Puricelli, E. y Tiesca, D. 2005. Weed density and diversity under glyphosate-resistant crop sequences. *Crop Protection*, 24: 533-542.
- Sabbatini, M.R., Irigoyen, J.H. y Vernavá, M.N. 2004. Capítulo 11: Estrategias Para el Manejo Integrado de Malezas: Problemática, Resistencia a Herbicidas y Aportes de la Biotecnología, En: *Biotecnología y mejoramiento Vegetal*, Eds: V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski. Editorial INTA, 343-354.
- Tiesca, D. y Nisensohn, L. 2001. Resistencia de *Amaranthus quitensis* H.B.K. a imazetapir y clorimurón-etil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 36: 601-606.
- Tiesca, D. y Puricelli, E. 2007. Effect of tillage systems and herbicide treatments on weed abundance and diversity in a glyphosate resistant crop rotation. *Crop Protection*, 26:1765-1770.
- Tiesca, D.; Nisensohn, L y Papa, J.C. 2008. Resistencia a glifosato en biotipos de sorgo de Alepo (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) de la región sojera núcleo de Argentina. XXVI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas, Ouro Preto, Brasil.
- Vigna, M.R., López, R.L., Gigón, R. y Mendoza, J. 2008. Estudios de Curvas Dosis-respuesta de Poblaciones de *Lolium multiflorum* a Glifosato en el SO de Buenos Aires, Argentina. XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas, Ouro Preto, Brasil, 4 al 8 de mayo de 2008. 13 pp.
- Vila-Aiub, M.; Balbi, M.; Gundel, P.; Ghersa, C. y Powles, S., 2007. Evolution of Glyphosate-Resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) in Glyphosate-Resistant Soybean. *Weed Science*, 55:566-571.
- Vila-Aiub, M.M.; Vidal, R.A.; Balbi, M.C.; Gundel, P.E.; Trucco, F. y Ghersa C.M., 2008. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Management Science*, 64:366–371.
- Vitta, J.; Faccini, D.; Nisensohn, L.; Puricelli, E.; Tiesca, D. y Leguizamón, E. 1999. Las malezas en la región sojera núcleo argentina: Situación actual y perspectivas. Cátedra de Malezas, Facultad de Ciencias Agrarias, U.N.R. Editada por DowAgro Sciences. Argentina S.A.
- Vitta, J.; Tiesca, D. y Puricelli, E. 2004. Widespread use of glyphosate tolerant soybean and weed community richness in Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 103: 621-624.
- Weed Science*. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. 2008. <http://www.weedscience.org/in.asp>