INFORMACION PUBLICA

SOLICITUD DE
PERMISO PARA LA LIBERACION EN AMBIENTE
EN PROGRAMA EXPERIMENTAL
DEL ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO
TRIGO RESISTENTE A SEQUIA

I. Caracterización del OGM

I. a) Identificador único del evento de transformación, de organismos internacionales de los que México sea parte, cuando exista.

Transformación de plantas de trigo harinero de la variedad Fielder mediante la técnica de Agrobacteria, utilizándose un gen de resistencia a sequía de plantas de arroz (*Oryza sativa)*.

I. b) Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México.

- **Especies relacionadas con el OGM**

Género *Triticum*:
Especies del género *Triticum* (no se mencionan las sinonimias):

- *Triticum aethiopicum*
- *Triticum araraticum*
- *Triticum boeoticum*
- *Triticum carthlicum*
- *Triticum compactum*
- *Triticum dicoccoides*
- *Triticum dicoccum*
- *Triticum durum*
- *Triticum ispahanicum*
- *Triticum karamyschevii*
- *Triticum macha*
- *Triticum militinae*
- *Triticum monococcum*
- *Triticum polonicum*
- *Triticum repens*
- *Triticum spelta*
- *Triticum sphaerococcum*
- *Triticum timopheevii*
- *Triticum turanicum*
- *Triticum turgidum*
- *Triticum urartu*
- *Triticum vavilovii*
- *Triticum zhukovskyi*

Género *Aegilops*
Especies del género *Aegilops* (no se mencionan las sinonimias):

- *Aegilops bicornis*
- *Aegilops columnaris*
- *Aegilops comosa*
- *Aegilops crassa*
- *Aegilops cylindrica*
- *Aegilops juvenalis*
- *Aegilops kotschyi*
- *Aegilops longissima*
- *Aegilops lorentii*
- *Aegilops neglecta*
- *Aegilops searsii*
- *Aegilops speltoides*
- *Aegilops tauschii*
- *Aegilops triuncialis*

- *Aegilops umbellulata*
- *Aegilops ventricosa*

- **Distribución en México**

El Herbario Nacional de México (Departamento de Biología, Facultad de Ciencias UNAM, México) cuenta con ejemplares de las siguientes especies de trigos, además de las entradas de correspondientes a *Triticum aestivum*:

- *Triricum campestris*. Fecha de recolección: 2/1/1980. Recolectado por Alicia Ortiz Calderón. No se especifica el lugar de recolección.
- *Triticum sativum.* 2 entradas. Recolectado en noviembre de 1917, en el Valle de Teotihuacán, Hacienda Santa Catarina, Estado de México.
- *Triticum sativum.* Recolectado en Curungueo, 4 km al norte de Zitacuaro, Michoacán, en marzo de 1984.
- *Triticum vulgare.* Recolectado en el Campo Experimental Pabellón, Estado de México, en noviembre de 1965

Aegilops cylindrica (Zacate cara de cabra), perteneciente a un género antecesor del trigo harinero, ha sido identificada en el Estado de Chihuahua (SAGAR, 1995). Esta especie se encuentra documentada en el Herbario Nacional, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias UNAM, México, con un espécimen recolectado por J. Valdés, en el Estado de Chihuahua, el 17 de mayo de 1975. Además, es reconocida como establecida en México por la Conabio (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad)
http://www.conabio.gob.mx/invasoras/index.php/Especies_invasoras_-_Plantas
Sin embargo, el género Aegilops no es enumerado en el listado de malezas frecuente en México:
http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm

No se han observado especies silvestres de trigo (*Triticum*) o emparentadas (*Aegilops*) en el área correspondiente al ensayo y zona aledaña.

Fuentes consultadas:
- Bases de datos de Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)
  - Conabio » Proyecto de bioseguridad GEF-CIBIOGEM » Consultas al Sistema de Información de los Organismos Vivos Modificados (SIOVM)
  - Conabio » Fichas especies NOM-059-SEMARNAT-2001 » Plantas

  - Red Mundial de Información sobre Biodiversidad - Red inter-institucional que comparte información biológica. Está constituida por nodos, formados por los centros de investigación que albergan las colecciones científicas.
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html

- Herbario, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias UNAM, México - Herbario Nacional.
http://www.ibiologia.unam.mx/mexu/

- Herbario de Geo. B. Hinton, México - http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/hinton.html

- Herbario Unidad Chetumal El Colegio de la Frontera Sur, Quintana Roo, México (CIQR)
http://w2.ecosur-qroo.mx/herbario.htm

- Herbario de la Universidad de Texas - Austin, EUA (LL, TEX) -
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ll-tex.html

I. c) Especificación de la existencia de especies sexualmente compatibles.

- Géneros que potencialmente podrían ser sexualmente compatibles con plantas de trigo:

- Especies del género *Triticum*

Al género *Triticum* pertenecen especies diploides y poliploides con varias combinaciones de genomas. Los posibles genomas del género *Triticum* son cinco (Am, Au, B, D y G) y según ellos se han clasificado a los trigos como:

T. aestivum; trigo harinero: posee el genoma B+Au+D
T. monococcum; posee el genoma Am
T. urartu; posee el genoma Au
T. turgidum; trigos duros, posee el genoma B+Au
T. timopheevi; posee en genoma G+Au

La fertilidad entre especies del género *Triticum* es posible de acuerdo con los niveles de ploidia y compatibilidad de los genomas. Las especies que comparten un mismo genoma son más interfértiles entre sí. Sin embargo, los híbridos resultantes de cruzamientos ínterespecíficos podrían ser estériles en su función masculina y parcialmente fértiles en su función femenina.

- Especies del género *Aegilops*

Se ha observado hibridización natural entre *Aegilops cylindrica* (Zacate cara de cabra) y plantas de trigo. El porcentaje de polinización cruzada entre plantas del género *Aegilops* y plantas de trigo se estima en un 2%. Sin embargo, la posibilidad de flujo génico es baja debido a que sería necesario que las especies estén físicamente cercanas y sean compatibles, que la emisión de polen esté sincronizada con el período receptivo del estigma, y que exista viabilidad en la descendencia.

- Especies del género *Secale*

El centeno (*Secale cereale*) es una especie relacionada con el trigo en forma más distante. Si bien la hibridización artificial entre centeno y trigo es posible, no se han encontrado híbridos naturales en Estados Unidos y no hay reportes de estos cruzamientos naturales en Canadá o México. El centeno no ha sido identificado como especie invasora o maleza.

Consideración general: Si llegara a ocurrir hibridización natural, hay tres dificultades para los híbridos resultantes de trigo y especies silvestres: i) la incompatibilidad, ii) la baja viabilidad en la F1 (primer generación), y iii) la esterilidad de la F1 o su descendencia.

- Presencia de especies sexualmente compatibles con trigo en el área de estudio:

Según los relevamientos y consultas realizadas, no se han encontrado especies de trigos o relacionadas con trigo creciendo en forma natural en el área de estudio.
Siendo que el ensayo se realizará en condiciones controladas, no habrá plantas relacionadas con el trigo -ajenas al ensayo- en el área correspondiente al ensayo y zonas cercanas.

Referencias (ver Documentos de soporte):

Hegde S. G., J. G. Waines. 2004. Hybridization and introgression between bread wheat and wild and weedy relatives in North America. Crop Science 44: 1145-1155.

Waines J. G., S. G. Hegde. 2003. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. Crop Science 43: 451-463.

Zaharieva M., P. Monneveux. 2006. Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. Crop Science 46: 512-527.

I. d) Descripción de los hábitats donde el OGM puede persistir o proliferar en el ambiente de liberación.

Las plantas de trigo transformadas podrían cultivarse en los mismos hábitats que las plantas de trigo convencional. Se sugiere que la presencia del transgén conferiría mayor tolerancia a la sequía, aunque no se ha demostrado a campo en cuánto o en qué etapa del desarrollo las plantas transformadas se verían beneficiadas.

El trigo es una especie adaptada a ambientes templados; sin embargo, su gran plasticidad y la necesidad de extender el área de cultivo a zonas marginales ha aumentado el área de siembra. A nivel mundial, se dedican a la producción de trigo más tierras que a cualquier otro cultivo comercial, llegando a 210 millones de hectáreas. La temperatura ideal para el crecimiento y desarrollo del cultivo de trigo está entre 10 y 24 ºC. El trigo puede desarrollarse bien con 300 ó 400 mm, siempre que la distribución sea adecuada. Comúnmente se cultiva en regiones de 400 a 750 mm anuales, aunque existen cultivos en regiones con precipitaciones de hasta casi 3000 mm. La floración es uno de los periodos de mayor sensibilidad a la falta de agua.

El trigo es el cereal alimentario número uno consumido directamente por los seres humanos y su producción supera la de cualquiera de los otros cultivos. Prácticamente todo el trigo en México se cultiva en condiciones de riego y la mayor parte en los valles costeros de los estados de Sonora y Sinaloa, en el noroeste de México. Se cultivan alrededor de 100,000 ha de trigo en la meseta central del país y también hay alguna producción en las tierras altas de temporal (Sagarpa-http://www.simom.gob.mx/siapmms).

Según información obtenida de SIAP- SAGARPA y Geographic Information Systems – CIMMYT. (www.simom.gob.mx/siapmms; www.siap.gob.mx) no se han encontrado cultivos extensivos de trigo en un radio de 20 km alrededor del área experimental propuesta.

I. e) Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética.

Clasificación taxonómica del organismo receptor:

Triticum aestivum (L)
- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Liliopsida
- Orden: Poales
- Familia: Poaceae
- Género: *Triticum*
- Especie: *aestivum*
- Nombre científico - *Triticum aestivum* (L)
- Nombres comunes – trigo harinero; trigo de primavera
- Trigo harinero: Trigo hexaploide (6x); genoma $BA^{u}D$
- Clasificación genética (GRIN Taxonomy for Plants) *T. aestivum* subespecie *aestivum*
- Nombre del germoplasma - Fielder

Organismos donadores:

Oryza sativa (arroz)
- Reino: Plantae
- División: Angiosperms
- Clase: Monocots
- Orden: Poales
- Familia: Poaceae
- Género: Oryza
- Especie: O. sativa
- Nombre binomial: *Oryza sativa*

Agrobacterium tumefaciens - Agrobacteria
- Reino: Bacteria

División: Proteobacteria
Clase: Alpha Proteobacteria
Orden: Rhizobiales
Familia: Rhizobiaceae
Género: *Agrobacterium*
Especie*: tumefaciens*
Nombre binomial*: Agrobacterium tumefaciens,* (Smith y Townsend, 1907)
Sinómimos*:*

Bacterium tumefaciens, (Smith y Townsend, 1907)
Pseudomonas tumefaciens, (Smith y Townsend, 1907) (Duggar, 1909)
Phytomonas tumefaciens, (Smith y Townsend, 1907) (Bergey *et al.,* 1923)
Polymonas tumefaciens, (Smith y Townsend, 1907) (Lieske, 1928)

Escherichia coli

Reino: Bacteria
División: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: *Escherichia*
Especie*: coli*
Nombre binomial: *Escherichia coli,* (Migula 1895) (Castellani y Chalmers, 1919)

Streptomyces spp

Reino*:* Bacteria
División: Actinobacteria
Orden: Actinomycetales
Familia: Streptomycetaceae
Género: Streptomyces
Nombre binomial: *Streptomyces hygroscopicus* (Waksman y Henrici, 1943)

Zea mays (maíz)

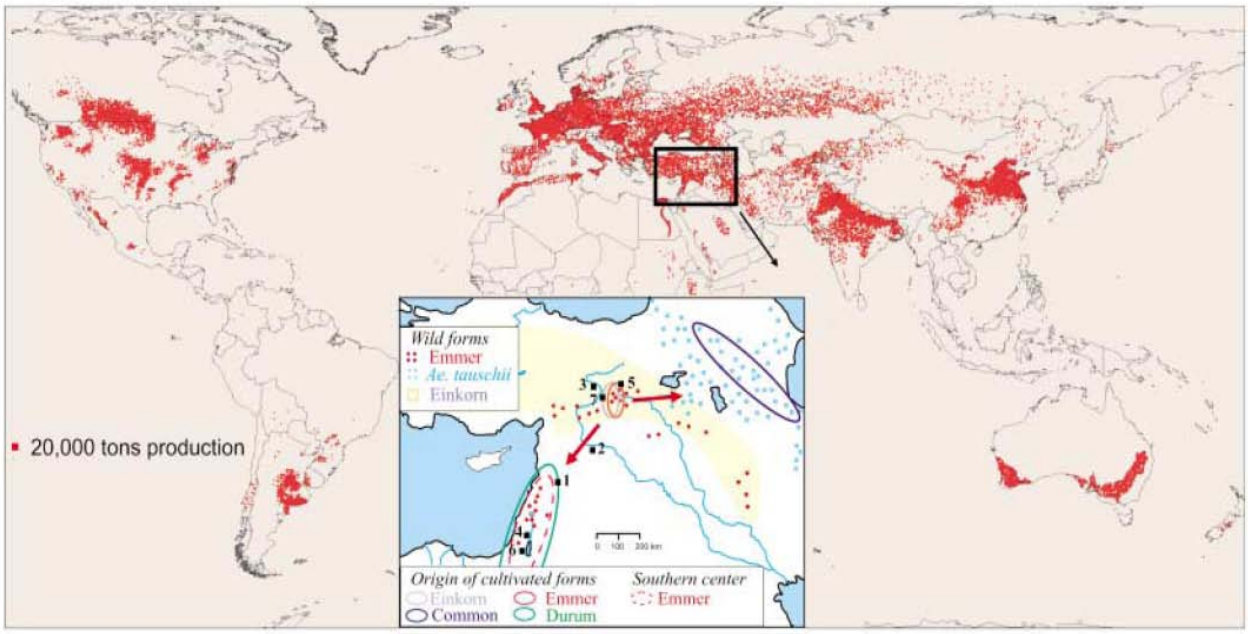
Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Poales
Familia: Poaceae
Género: Zea
Especie: mays
Nombre binomial: Zea mays L.

I. f) País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido.
El lugar de origen es el Centro de Biotecnología Aplicada, en la sede del CIMMYT en El Batán, Texcoco, México.

I. g) Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor.

El trigo tiene sus orígenes en el Sudoeste Asiático. Las evidencias arqueológicas más antiguas del cultivo de trigo vienen de Siria, Jordania, Turquía e Irak. En el siglo XIX aparece el molino de vapor con rodillos o cilindros de hierro que representó un cambio radical en la molienda. El cultivo del trigo fue aumentando a la par con estos y otras tecnologías que permitieron mejorar el rendimiento de la planta y llegar a diversas regiones del planeta.

Figura 1. Centro de origen y actual distribución del cultivo de trigo. Los óvalos en la figura central representan las regiones de origen de las formas cultivadas.



Referencia (ver Documentos de soporte): Dubcovsky J., J. Dvorak. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science 316 (5833): 1862-1866.

I. h) Secuencia génica detallada del evento de transformación, incluyendo tamaño del fragmento insertado, sitio de inserción de la construcción genética, incluyendo las secuencias de los oligonucleótidos que permitan la amplificación del sitio de inserción.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, y los resultados de los experimentos que comprueben los datos anteriores, así como la expresión de mensajeros del evento de transformación genética, incluyendo la demostración de los resultados.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. j) Mapa de la construcción genética, tipo de herencia de los caracteres producto de los genes insertados, expresión de las proteínas y localización de las mismas.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. k) Descripción del método de transformación.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. l) Descripción, número de copias, sitios de inserción y expresión de las secuencias irrelevantes para la expresión de la modificación genética y en su caso, la identificación de los efectos no esperados.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. m) Secuencia de aminoácidos y de las proteínas novedosas expresadas por el OGM, tamaño del producto del gen, expresión de copias múltiples.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. p) Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras incluyendo promotores, terminadores y otras, y su descripción, número de copias insertadas, pertenencia de éstas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. q) Patogenicidad o virulencia de los organismos donadores y receptores.

Agrobacterium tumefaciens- Agrobacteria
Es una bacteria gram-negativa. Esta bacteria ataca los tejidos de las plantas causando tumores. El tumor corresponde con la presencia de un plásmido que induce tumores (plásmido Ti).

Fuente de esta descripción:
Solicitud de Permiso para Liberación Experimental al Ambiente del Organismo Genéticamente Modificado Algodón Solución FAENA FLEX® (MON-88913-8) en el campo experimental INIFAP, Tecoman, Colima durante el Ciclo Agrícola Otoño- Invierno (OI) 2008/2009; presentada por Sagarpa como modelo (http://148.243.71.63/default.asp?doc=1419).

Agrobacterium tumefaciens es un fitopatógeno que habita de manera natural en el suelo, el cual utiliza un proceso de ingeniería genética natural para alterar la maquinaria metabólica de las células de la planta hospedante. Este proceso hace que las plantas hospedantes desvíen suministros de carbono y nitrógeno orgánico para la producción de nutrientes (opinas) que pueden ser específicamente catabolizados por la bacteria invasora. Las células infectadas son inducidas a proliferar. La enfermedad de la agalla de la corona es el resultado directo de la incorporación de una región de ADN-transferible (ADN-T), del plásmido circular Ti (inducción de tumor) de 150 a 250 kB, transferido por *A. tumefaciens* dentro del genoma de la planta hospedante.
Cuando *Agrobacterium* es aislada de las raíces de las plantas en ambientes naturales o bajo cultivo, la mayoría de las cepas (más del 90%) no son patogénicas, aún cuando muchos aislamientos son hechos de plantas enfermas. Por lo tanto, *Agrobacterium* es esencialmente un habitante de la rizosfera y únicamente una proporción muy pequeña de cepas son fitopatógenas (contienen el plásmido Ti), las cuales causan la enfermedad conocida como agalla de la corona en un amplio rango de plantas dicotiledóneas especialmente rosáceas como manzana, pera, durazno, cereza, almendra, frambuesa y rosal. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de un tumor al nivel del suelo y aunque reduce el valor comercial de la cosecha, generalmente no causa problemas serios en plantas maduras bien establecidas. La bacteria entra a la planta a través de heridas y transfiere una fracción de su DNA, denominada DNA-T, a las células de las plantas causando la formación de un tumor. El tumor se desarrolla debido a que el DNA-T contiene genes que regulan la biosíntesis de hormonas vegetales como el ácido indolacético y citocininas. Las células infectadas producen unas sustancias denominadas opinas, las cuales son usadas por la bacteria como fuente de energía. El desarrollo de los síntomas en la planta infectada depende de la temperatura, humedad y estado de crecimiento; conforme el tumor incrementa su tamaño la habilidad de la planta para obtener nutrientes disminuye y finalmente detienen su crecimiento con lo cual también empieza la decadencia del tumor liberando las bacterias en el suelo.
La bacteria puede permanecer activa en el suelo o en tumores viejos en ausencia de un hospedero adecuado durante un mínimo de dos años y puede dispersarse a través del movimiento de suelo infectado, implementos agrícolas, escurrimiento de agua o a través de insectos succionadores de savia.
Generalmente las bacterias se reproducen por bipartición. Tras la duplicación del DNA, dirigida por la DNA-polimerasa que se encuentra en los mesosomas, la pared bacteriana crece hasta formar un tabique transversal separando las dos nuevas bacterias. Además de este tipo de reproducción asexual, las bacterias poseen mecanismos de reproducción sexual, mediante los cuales se intercambian fragmentos de DNA, los cuales pueden ser:

- Transformación: Consiste en el intercambio genético producido cuando una bacteria es capaz de captar fragmentos de DNA, de otra bacteria que se encuentran dispersos en el medio donde vive.
- Conjugación: En este proceso, una bacteria donadora F+ transmite a través de un puente o pili, un fragmento de DNA, a otra bacteria receptora F-. La bacteria que se llama F+ posee un plásmido, además del cromosoma bacteriano.
- Transducción: En este caso la transferencia de DNA de una bacteria a otra, se realiza a través de un virus bacteriófago, que se comporta como un vector intermediario entre las dos bacterias.

Algunas bacterias encontradas en el suelo como las especies fitopatógenas del género *Agrobacterium* pueden transferir DNA a las plantas a través del mecanismo denominado transformación. Existen otros dos mecanismos, conjugación (intercambio de plásmido entre bacterias compatibles) y transducción (transferencia viral de DNA dentro de una bacteria), los cuales son altamente específicos y no tienen un potencial relevante para la transferencia de DNA. En general la habilidad de las bacterias para aceptar DNA del ambiente varía marcadamente entre las diferentes especies y la frecuencia de transformación, aún bajo condiciones ideales, es muy baja.
Agrobacterium tumefaciens son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gramnegativas, flageladas, perítricas; forma colonias mucoides y blancas. La composición de bases de DNA varía de 58 a 63.5% GC.

Escherichia coli
Los miembros de este género son habitantes del tracto intestinal de los humanos y animales de sangre caliente. Esta bacteria es ampliamente utilizada en los procesos de biotecnología y transformación y microbiología industrial.
Sang Yup Lee (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology 14: 98-105.

Streptomyces hygroscopicus
Las especies Streptomyces son miembros de la familia de los actinomicetos y se las encuentra en el suelo. Unas cuantas especies Streptomyces provocan enfermedades en el hombre, pero ninguna enfermedad ha sido atribuida al microorganismo que da origen al gen *bar*, *Streptomyces hygroscopicus*. Este método se utiliza ampliamente como método de selección de plantas genéticamente transformadas.

Zea mays (maíz)
Gramínea anual originaria de América e introducida en Europa en el siglo XVI. Actualmente, es el cereal con mayor volumen de producción en el mundo, superando al trigo y el arroz. Es una planta monoica; sus inflorescencias masculinas y femeninas se encuentran en la misma planta. Su rápido crecimiento le permite alcanzar hasta los 2,5 m de altura, con un tallo erguido, rígido y sólido. Cada mazorca consiste en un tronco que está cubierto por filas de granos, la parte comestible de la planta, cuyo número puede variar entre ocho y treinta. El grueso recubrimiento de brácteas de su mazorca, la forma en que los granos se encuentran dispuestos y están sólidamente sujetos, impiden que la planta pueda dispersar sus granos. Diferentes grados de dormancia se han observado en distintas variedades o híbridos. No posee características de patogenicidad o virulencia, ni potencial como maleza.

Oryza sativa (Arroz)
Es un cereal, monocotioledónea perteneciente a la familia *Poaceae*, considerado como alimento básico en muchas culturas. El cultivo del arroz comenzó hace casi 10.000 años, en muchas regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. Posiblemente sea la India el país donde se cultivó por primera vez, aunque el desarrollo del cultivo tuvo lugar en China. Los suelos inundados ofrecen un ambiente único para el crecimiento y nutrición del arroz.
El arroz es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Si se considera su importancia como cultivo alimenticio, el arroz proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cultivo de cereales. No posee características de patogenicidad o virulencia, ni potencial como maleza.

I. r) Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotipo que confiere estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de éstos genes.
INFORMACION CONFIDENCIAL

I. s) Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgen.
El gen presenta herencia tipo mendeliana y en base a este patrón de segregación se han seleccionado las familias de las cuales se ha multiplicado semilla. Los eventos transformados seleccionados presentan un número de una o dos copias del plásmido insertado, lo cual junto con el estado de homozigosis, fue constatado por análisis de segregación (control de la presencia del transgén por PCR en generaciones T0, T1 y T2), PCR y Souther blot. Específicamente, los análisis de PCR en semilla T1 identificaron las familias segregando con uno o dos transgenes. Semilla T2 de al menos 12 eventos diferentes T1 (single locus events) o 24 diferentes eventos T1 (two locus events) se sembraron para la selección los individuos en estado de homozigosis. La semilla de estas plantas T2 seleccionadas está siendo multiplicada en invernaderos de bioseguridad.

I. t) Referencia bibliográfica sobre los datos presentados.
Dubcovsky J., J. Dvorak. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science 316 (5833): 1862-1866.
Hegde S. G., J. G. Waines. 2004. Hybridization and introgression between bread wheat and wild and weedy relatives in North America. Crop Science 44: 1145-1155.
Waines J. G., S. G. Hegde. 2003. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. Crop Science 43: 451-463.
Zaharieva M., P. Monneveux. 2006. Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. Crop Science 46: 512-527.

II. Identificación de la zona o zonas donde se pretenda liberar el OGM

II. a) Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.

Area máxima para estos eventos de trigos transgénicos= 0.1 Ha
Area máxima para el ensayo total= 0.5 Ha
Se propone incluir en el mismo ensayo experimental eventos transformados con diferentes combinaciones de genes y promotores, a fin de determinar la combinación gen-promotor más exitosa en la respuesta al estrés hídrico. Dado que cada combinación requiere un permiso de siembra independiente, el diseño de siembra, área a sembrar, y cantidad exacta de semilla a movilizar estará en función de la cantidad de eventos que reciban la aprobación para ser incluidos en el ensayo.

II. b) Ubicación, en coordenadas UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación.

II. c) Descripción de los polígonos donde se realizará la liberación y de las zonas vecinas a éstos según las características de diseminación del OGM de que se trate.

La ruta de acceso y caminos internos, así como las colindancias, se encuentran descriptas en los mapas que se adjuntan como anexo en copia impresas.
Este lote y los lotes cercanos al área experimental son generalmente utilizados para el cultivo de maíz.

II. c. 1) Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos.

No se han observado especies silvestres de trigo (*Triticum*) o emparentadas (*Aegilops*) en el área correspondiente al ensayo y zona aledaña.
Se establecerán medidas de control para garantizar que no habrá especies sexualmente compatibles con el trigo -ajenas al ensayo- en el área correspondiente al ensayo y zonas vecinas (ver medidas de seguridad a implementar).

II. c. 2) Descripción geográfica.

El ensayo se realizará en el Estado de Morelos, México.
La flora está compuesta por tepehuaje, palo dulce, copal, cuahulote, cubata, guamuchil, ciruelo, cuachalalate, mezquite, brasil, guayabillo, guaje, bonete, casahuate, pega hueso, quina, etc.
La fauna está compuesta por tejón, zorrillo, armadillo, aguililla, paloma ala blanca, víbora de cascabel, codorniz, conejo común, coyote, escorpión, gavilán, huilota, iguana, tlacuache, chachalaca, urraca copetona, zopilote, venado, etc.
El Estado de Morelos cuenta con un clima ideal para la agricultura, una gran variedad de vegetales son cultivados durante todo el año.
Según información obtenida de SIAP- SAGARPA y Geographic Information Systems – CIMMYT. (www.simom.gob.mx/siapmms; www.siap.gob.mx) no se han encontrado cultivos extensivos de trigo en radio de 20 km alrededor del área experimental propuesta.

II. c. 3) Plano de ubicación señalando las principales vías de comunicación.

La ruta de acceso y caminos internos, así como las colindancias, se encuentran descriptas en los mapas que se adjuntan como anexo en copia impresas.

III. Estudio de los posibles riesgos que la liberación de los OGMs pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica a los que se refiere el artículo 42, fracción III, de la Ley.
Contendrá, además de lo dispuesto en el artículo 62 de la Ley, la información siguiente:

III. a) Estabilidad de la modificación genética del OGM.

El gen presenta herencia tipo mendeliana y en base a este patrón de segregación se han seleccionado las familias de las cuales se ha multiplicado semilla. Los eventos transformados seleccionados presentan un número de una o dos copias del plásmido insertado, lo cual junto con el estado de homozigosis, fue constatado por análisis de segregación (control de la presencia del transgén por PCR en generaciones T0, T1 y T2), PCR y Souther blot. Específicamente, los análisis de PCR en semilla T1 identificaron las familias segregando con uno o dos transgenes. Semilla T2 de al menos 12 eventos diferentes T1 (single locus events) o 24 diferentes eventos T1 (two locus events) se sembraron para la selección los individuos en estado de homozigosis. La semilla de estas plantas T2 seleccionadas está siendo multiplicada en invernaderos de bioseguridad.

III. b) Expresión del gen introducido, incluyendo niveles de expresión de la proteína de interés en los diversos tejidos, así como los resultados que lo demuestren.
INFORMACION CONFIDENCIAL

III. c) Características del fenotipo del OGM.

Las plantas transformadas tendrían mejor tolerancia a la sequía que las plantas no transformadas. Sin embargo, la correcta evaluación de la respuesta de las plantas a la sequía debe realizarse en condiciones de campo, ya que en estas condiciones es en donde la planta mejor expresa su potencial de respuesta ante el factor de estrés. En condiciones de campo, el estrés hídrico progresa en forma más realística y gradual que en condiciones de invernadero, permitiendo a las plantas activar los caminos fisiológicos de tolerancia al estrés.

Las líneas de trigo transgénico descritas en esta solicitud difieren del trigo no transformado sólo por la presencia del transgén. La apariencia de las plantas que contienen estos genes no es distinta de la de las plantas de trigo convencionales. Las evaluaciones realizadas en invernadero han demostrado que las plantas transformadas no difieren en sus características fenotípicas básicas del trigo convencional, siendo el ciclo biológico y morfología similar entre plantas transformadas y trigos convencionales.

El gen introducido ocurre naturalmente en muchas especies vegetales. La única diferencia entre los trigos transgénicos y los trigos convencionales es en el nivel de expresión o en el momento de expresión de los productos que normalmente regula el gen.

En las pruebas en el invernadero, los genotipos de trigo transgénico toleran el rociamiento con Basta y las plantas testigo no transgénicas no lo toleran. Esta condición de resistencia al herbicida esta sólo relacionada al proceso de transformación, y no implica prácticas agronómicas o tratamientos diferenciales en condiciones de campo. Es decir, el gene de resistencia al herbicida ha sido introducido únicamente como marcador de selección y no para propósitos agronómicos.

III. d) Identificación de cualquier característica física y fenotípica nueva relacionada con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y en el medio ambiente receptor del OGM.

No se observaron característica físicas o fenotípicas relacionadas con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y en el medio ambiente.

III. e) Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, la cual incluya al menos, ciclo biológico y cambios en la morfología básica.

Las plantas transformadas tendrían mejor tolerancia a la sequía que las plantas no transformadas. Sin embargo, la correcta evaluación de la respuesta de las plantas a la sequía debe realizarse en condiciones de campo, ya que en estas condiciones es en donde la planta mejor expresa su potencial de respuesta ante el factor de estrés. En condiciones de campo, el estrés hídrico progresa en forma más realística y gradual que en condiciones de invernadero, permitiendo a las plantas activar los caminos fisiológicos de tolerancia al estrés.

Dado el protocolo de transformación seguido, los genotipos de trigo transgénico toleran el rociamiento con Basta y las plantas testigo no transgénicas no lo toleran. Esta condición de resistencia al herbicida esta sólo relacionada al proceso de transformación, y no implica prácticas agronómicas o tratamientos diferenciales en condiciones de campo. Es decir, el gene de resistencia al herbicida ha sido introducido únicamente como marcador de selección y no para propósitos agronómicos.

Las evaluaciones realizadas en invernadero han demostrado que las plantas transformadas no difieren en sus características fenotípicas básicas del trigo convencional, siendo el ciclo biológico y morfología similar entre plantas transformadas y trigos convencionales. Las líneas de trigo transgénico descritas en esta solicitud difieren del trigo no transformado sólo por la presencia del transgén. La apariencia de las plantas que contienen estos genes no es distinta de la de las plantas de trigo convencionales. La única diferencia con trigos convencionales es en el nivel de expresión o en el momento de expresión de los productos que normalmente regula el gen.

III. f) Declaración sobre la existencia de efectos sobre la diversidad biológica y al medio ambiente que se puedan derivar de la liberación del OGM.

En las experiencias realizadas en invernadero no se observaron efectos relacionadas con el OGM que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y en el medio ambiente.

El gen de selección utilizado es de resistencia al herbicida Basta. La posibilidad de flujo génico hacia malezas es muy baja. Este gen marcador ha sido utilizado en numerosos cultivos transgénicos, sin demostrarse efectos adversos al medio ambiente. Un ejemplo del uso del gen *bar* en cultivos transgénicos de trigo sembrados a campo puede encontrarse en el trabajo de Miroshnichenko y colaboradores (2007). El bajo riesgo ambiental ha sido documentado también en otros cultivos (Bae *et al*., 2008).

III. g) Descripción de uno o más métodos de identificación del evento específico del OGM, incluyendo niveles de sensibilidad y reproducibilidad, con la manifestación expresa del promovente de que los métodos de identificación son los reconocidos por el desarrollador del OGM para la detección del mismo.
INFORMACION CONFIDENCIAL

III. h) Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas.

El riesgo de flujo génico es muy bajo dado las características reproductivas del trigo (véase anexos) y el estricto control en el área experimental. Sin embargo, si ocurriera hibridización natural, hay tres dificultades para los híbridos resultantes de trigo y especies relacionadas: i) la incompatibilidad entre padres, ii) la baja viabilidad en la F1 (primera generación), y iii) la esterilidad de la F1 o su descendencia. Dado el caso que fuera posible la hibridización, el gene *bar* de plantas transformadas

podría otorgar cierta resistencia al herbicida Basta, pero hay que señalar que el gene de resistencia a los herbicidas ha sido introducido únicamente como marcador seleccionable y no para propósitos agronómicos.

III. i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados.

Bae, T. W., E. Vanjildorj, S. Y. Song, S. Nishiguchi, S. S. Yang, I. J. Song, T. Chandrasekhar, T. W. Kang, J. I. Kim, Y. J. Koh, S. Y. Park, J. Lee, Y.-E. Lee, K. H. Ryu, K. Z. Riu, P.-S. Song, H. Y. Lee. 2008. Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. J. Environ. Qual. 37: 207-218.

Hegde S. G., J. G. Waines. 2004. Hybridization and introgression between bread wheat and wild and weedy relatives in North America. Crop Sci. 44: 1145-1155.

Miroshnichenko D., M. Filippov, S. Dolgov. 2007. Genetic transformation of Russian wheat cultivars. Agriculture and Environment Biotechnology, Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 21/2007/4, 399-402.

Waines J. G., S. G. Hegde. 2003. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. Crop Sci. 43: 451-463.

Zaharieva M., P. Monneveux. 2006. Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. Crop Sci. 46: 512-527.

Otros documentos:

Estados Unidos
http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/index.shtml
http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/brs_main.shtml

Comunidad Europea –
Deliberate release into the environment of GMOs
http://gmoinfo.jrc.it/gmp_browse.aspx

Canadá-
http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/confine.shtml#sum
http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dt/term/2005/triaeste.shtml

Australia-
The Biology of *Triticum aestivum* L. em Thell. (Bread Wheat) – Documento adjunto como anexo.
Office of the Gene Technology Regulator - Australian Government Office of the Gene Technology Regulator. <http://www.ogtr.gov.au>
http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/wheat-4/$FILE/biologywheat08.rtf

IV. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad y de bioseguridad a llevar a cabo

IV. a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad:

IV. a. 1. Plan de monitoreo detallado.

Informes: se informará a las autoridades del Comité de Bioseguridad de CIMMYT y a las autoridades de los organismos de control correspondientes sobre toda práctica de manejo a realizar en el ensayo, previo a la siembra, durante el ciclo del cultivo y posterior a la cosecha. Dichas autoridades tendrán autorización para efectuar controles programados u observar las parcelas sin previo aviso.
El plan de actividades a realizar será detallado en una bitácora donde se llevará el registro escrito de los trabajos de campo. Esta bitácora incluirá todos los sucesos que tuvieron lugar durante la realización de las tareas de campo, las fechas de los eventos, las fallas que se produjeron, los cambios que se introdujeron al plan original de trabajo y los costos que ocasionaron. La bitácora estará disponible para el control por parte de las autoridades.

- Plan de monitoreo anterior a la siembra

Consistirá en la observación, documentación y destrucción de toda planta de trigo o especie relacionada con el trigo observada en la zona experimental y zona aledaña durante la preparación del terreno previo a la siembra.

- Plan de monitoreo durante el ciclo de cultivo

Consistirá en la observación, documentación, y destrucción de toda planta de trigo o especie relacionada con el trigo observada en la zona experimental y zona aledaña y no relacionada al ensayo propuesto. La destrucción de estas plantas se realizará según los protocolos de destrucción de plantas transgénicas descriptos.

- Plan de monitoreo finalizado el ciclo de cultivo

Consistirá en la observación, documentación, y destrucción de toda planta de trigo o especie relacionada con el trigo creciendo como voluntaria en la zona experimental, por un periodo de 2 ciclos agrícolas posteriores a los ensayos experimentales con trigos transgénicos. La destrucción de estas plantas se realizará según los protocolos de destrucción de plantas transgénicas descriptos.

IV. a. 2. Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación del OGM, con el fin de detectar cualquier interacción entre el OGM y especies presentes relevantes, directa o indirectamente, en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación, cuando existan.

Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación

- El ensayo se realizará en condiciones controladas, por lo cual se procederá a un estricto control de malezas y no habrá especies silvestres de trigo en el área correspondiente al ensayo.

- Plan de monitoreo durante el ciclo de cultivo

Consistirá en la observación, documentación, y destrucción de toda planta de trigo o especie relacionada con el trigo observada en la zona experimental y zona aledaña y no relacionada al ensayo propuesto.

- Plan de monitoreo finalizado el ciclo de cultivo

Consistirá en la observación, documentación, y destrucción de toda planta de trigo o especie relacionada con el trigo creciendo como voluntaria en la zona experimental, por un periodo de 2 ciclos

agrícolas posteriores a los ensayos experimentales con trigos transgénicos. La destrucción de estas plantas se realizará según los protocolos de destrucción de plantas transgénicas descriptos.

IV. a. 3. Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona o zonas donde se pretenda realizar la liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación.

Como medida de control, será destruido todo trigo que emergiera como voluntario, por un periodo de dos ciclos agrícolas posteriores a la liberación del trigo transgénico.

El comité de Bioseguridad de CIMMYT establece controles rutinarios para evitar la contaminación con transgénicos. Ver además otras medidas de seguridad detalladas en este documento.

IV. *b) Medidas y procedimientos de bioseguridad:*

IV. b. 1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación.

Medidas de bioseguridad

1- Traslado de material transgénico.

A- Empaque de semilla

Las semillas se colocarán en sobres de aluminio termo-sellables. Dichos sobres se dispondrán en cajas de cartón selladas, y todo el paquete será colocado dentro de bolsas de plástico especial para el traslado de material transgénico, la cual se sella a fin de garantizar su traslado seguro. Estas bolsas son lo suficientemente fuertes para impedir la salida sin control de la semilla.



B- Identificación del material a trasladar:

a- Etiquetado de sobres:

SEMILLA DE TRIGO TRANSGENICA
USO EXPERIMENTAL

GENOTIPO: XX
TRATAMIENTO: Sequía/Riego y etapa a aplicarse el tratamiento
PARCELA: XX

PROPIETARIO: CIMMYT- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
Km. 45, Carretera México-Veracruz, El Batán, Texcoco, Edo. de México- 56130 México

PERSONA RESPONSABLE:

b- Etiquetado de cajas y bolsas:

SEMILLA DE TRIGO TRANSGENICA
USO EXPERIMENTAL

PROPIETARIO: CIMMYT- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
Km. 45, Carretera México-Veracruz, El Batán, Texcoco, Edo. de México- CP 56130 México

PERSONA RESPONSABLE:

C- Guías de traslado

Se confeccionará una guía conteniendo el inventario de la semilla a trasladar. En dicho documento constará el número de sobres e identificación de los mismos, lugar de salida y de destino final, y persona responsable por los mismos. Una copia permanecerá en el sitio de salida, otra copia será trasladada con el material, y una tercera copia será el documento de control de la autoridad que reciba el material.

D- Recepción del material y almacenamiento en el sitio de llegada

Previo a la siembra, una autoridad de bioseguridad controlará el arribo del material, asegurándose de que toda la semilla coincida con lo declarado en la guía de trasporte. Toda anomalía será reportada a la autoridad competente. La semilla será guardada bajo llave hasta el momento de la siembra.
Luego de la cosecha, una autoridad de bioseguridad controlará el arribo del material al Laboratorio de Bioseguridad del CIMMYT, El Batan, Texcoco, Estado de México, asegurándose de que coincida con lo declarado en la guía de trasporte. Toda anomalía será reportada a la autoridad competente. La semilla será almacenada en la zona de bioseguridad destinada a tal fin.

E- Medidas en caso de accidente

En caso de accidente durante el transporte se procederá a la recolección manual del material o quema del mismo en el lugar del accidente si no fuera posible su total recolección. Inmediato al accidente se informará a las autoridades de Bioseguridad de CIMMYT y de los organismos de control fitosanitario. La zona del accidente será identificada y monitoreada por la presencia de trigos transgénicos.

2- Controles en la siembra

A- Apertura de los sobres:

Los sobres serán abiertos sólo cuando se encuentren seguros, previo a la siembra. Ya en las parcelas experimentales, los paquetes serán abiertos por un funcionario de bioseguridad, quien estará presente durante la siembra de la semilla.





B- Material sobrante de la siembra:

Toda la semilla que no se siembre se volverá a empacar en sobres, que se dispondrán en cajas y luego en la bolsa para el traslado de transgénicos. Se identificarán los sobres, cajas y bolsas según lo descripto en el punto 1.B. Dicho material se regresará al Laboratorio de Biotecnología del CIMMYT, El Batan, Texcoco, según el protocolo de traslado descripto.

C- Destrucción de materiales:

Únicamente se abrirán los paquetes en el momento inmediato a la siembra en el área experimental, bajo la supervisión de la autoridad de control fitosanitario.

Un funcionario de bioseguridad estará presente durante la siembra con el fin de asegurarse de que toda la semilla que no sea sembrada se vuelva a empacar en la forma descrita para el traslado. De presentarse semilla sobrante, se regresará al Laboratorio de Bioseguridad en la sede del CIMMYT, El Batán, Texcoco, Estado de México, según el protocolo de traslado descripto que contempla el correcto etiquetado, empaque, inventario y control de salida y llegada del material.

Los sobres, cajas y bolsas vacías que no sea necesario conservar se quemarán dentro del área experimental. Los sobres, cajas y bolsas vacías que se necesite conservar se regresarán al Laboratorio de Bioseguridad en la sede del CIMMYT, El Batán, Texcoco, Estado de México, siguiendo los protocolos de traslado descritos. Ya en la institución, todo este material será esterilizado utilizándose una autoclave disponible en el área de bioseguridad.

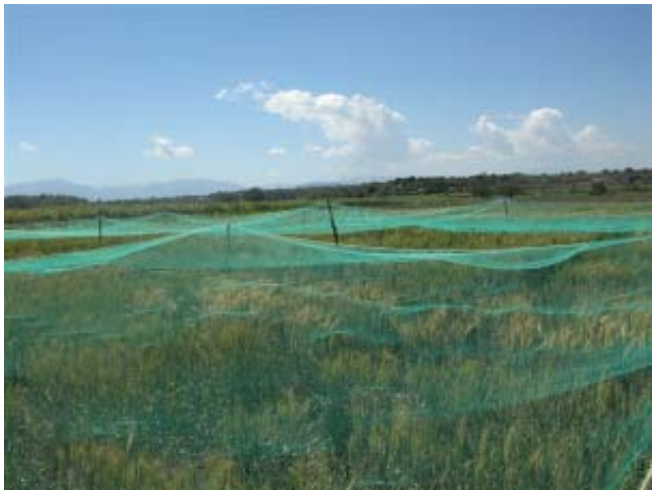
3- Ubicación del experimento y diseño experimental

- Aislamiento del ensayo:
    - Bordes e hileras del cultivo convencional (no modificado genéticamente):
        - Se sembrará una barrera de trigo duro convencional (no modificado genéticamente) sobre los lados del perímetro sembrado con transgénicos, con una distancia mínima de 2.25 m.
        - Se sembrará una barrera de maíz convencional (no modificado genéticamente) sobre los lados del perímetro sembrado con transgénicos.
    - Se dejará sin sembrar (suelo arado) un área perimetral de 10 m alrededor del ensayo.
    - Se mantendrá un área de aislamiento de 100 m libre de especies sexualmente compatibles con trigo; en concordancia con documentos presentados por USDA (Estados Unidos), Comunidad Europea, Canadá y Australia (ver anexos; véase también Waines y Hegde, 2003).

    - No se sembrarán otros ensayos convencionales en el área aislada para este estudio.

- Habrá un estricto control de plagas y malezas en el área del ensayo.

- Si bien el polen de trigo no es dispersado por agentes vectores (ver documento de soporte "The Biology of Triticum aestivum L. em Thell. –Bread Wheat), la presencia de animales pequeños como ratones será controlada con cebos tóxicos. Durante la época en que los granos pudieran atraer a los pájaros se tomarán medidas de control como la cobertura con mallas para limitar el acceso de las aves.



-Durante el periodo de floración, todo el personal utilizará ropa especial (batas) dentro del área experimental. Las batas serán colocadas en bolsas plásticas cerradas al finalizarse las tareas de campo.



- Luego de la cosecha, todo el área será irrigada para favorecer la germinación de semillas que puedan haber caído en forma natural. Las plantas que emergieran serán eliminadas por quema.

- El área experimental estará identificada con letreros que indiquen la siembra de productos transgénicos y que éstos no son utilizados para el consumo humano o animal.

- El área se encuentra cercada y con seguridad.





4- Destrucción de materiales de cosecha.

Un funcionario de bioseguridad del CIMMYT y autoridades de los organismos de control fitosanitario estarán presente durante la cosecha con el fin de asegurarse de que toda la semilla o espigas se prepare en la forma descrita para el traslado, que contempla el correcto etiquetado, empaque, inventario y control de salida y llegada del material. Estas semillas o espigas se enviarán al Laboratorio de Bioseguridad en la sede del CIMMYT, El Batán, Texcoco, Estado de México, según el protocolo de traslado terrestre descripto. Ya en la institución, todo el material acompañante será esterilizado utilizándose una autoclave disponible en el área de bioseguridad. La semilla será almacenada en la zona de bioseguridad destinada a tal fin.

En caso de accidente durante el transporte se procederá a la recolección manual del material o quema del mismo en el lugar del accidente si no fuera posible su total recolección. Inmediato al accidente se informará a las autoridades de Bioseguridad de CIMMYT y de los organismos de control fitosanitario. La zona del accidente será identificada y monitoreada por la presencia de trigos transgénicos.

Los materiales que no sea necesario conservar ni enviar a la sede del CIMMYT, El Batán, Texcoco, Estado de México, se quemarán dentro del área experimental.

Seguridad:
- Sólo el personal autorizado tendrá acceso. El perímetro se encuentra cercado.

5- Programa de capacitación del personal involucrado.
Sólo personal autorizado y capacitado participará en la toma de datos y manejo del cultivo. El personal recibirá las instrucciones y normas de manejo por escrito y también se le explicará en forma oral sobre las medidas de seguridad que rigen este ensayo. Es decir, todo el personal que trabaje en este ensayo recibirá la capacitación necesaria para comprender las normas de seguridad e importancia de las mismas y comprometerse a su cumplimiento.

7- Verificación de las medidas de bioseguridad.

- Interna. Se implementará un sistema de autocontrol en todo el personal involucrado en las tareas de campo, mediante la capacitación y toma de conciencia del material sembrado.
- Externa. Habrá un doble control externo ejercido por autoridades del Comité de Bioseguridad del CIMMYT y por las autoridades de los organismos fitosanitarios de control.

IV. b. 2. Medidas y procedimientos para disminuir el acceso de organismos vectores de dispersión, o de personas que no se encuentren autorizadas para ingresar al área de liberación a dicha zona o zonas.

El perímetro del área experimental se encuentra cercado y con seguridad. Sólo el personal autorizado tendrá acceso. Todo el personal que trabaje en este ensayo recibirá la capacitación necesaria para comprender las normas de seguridad e importancia de las mismas y comprometerse a su cumplimiento.

Si bien el polen de trigo no es dispersado por agentes vectores (ver documento de soporte "The Biology of *Triticum aestivum* L. em Thell. –Bread Wheat), la presencia de animales pequeños como ratones será controlada con cebos tóxicos. Durante la época en que los granos pudieran atraer a los pájaros se tomarán medidas de control como la cobertura con mallas para limitar el acceso de las aves.

IV. b. 3. Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas.

Consistirá en la observación, documentación, y destrucción de toda planta de trigo o especie relacionada con el trigo creciendo como voluntaria, por un periodo de 2 ciclos agrícolas posteriores a los ensayos experimentales con trigos transgénicos.
El comité de Bioseguridad de CIMMYT establece controles rutinarios para evitar la contaminación con transgénicos.

IV. b. 4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar experimentalmente el OGM.

- Aislamiento del ensayo:
  - Bordes e hileras de cultivo convencional (no modificado genéticamente):
    - Se sembrará una barrera de trigo duro convencional (no modificado genéticamente) sobre los lados del perímetro sembrado con transgénicos, con una distancia mínima de 2.25 m.
    - Se sembrará una barrera de maíz convencional (no modificado genéticamente) sobre los lados del perímetro sembrado con transgénicos.

  - Se dejará sin sembrar (suelo arado) un área perimetral de 10 m alrededor del ensayo.
  - Se mantendrá un área de aislamiento de 100 m libre de especies sexualmente compatibles con trigo; en concordancia con documentos presentados por USDA (Estados Unidos), Comunidad Europea, Canadá y Australia (ver anexos; véase también Waines y Hegde, 2003).

  - No se sembrarán otros ensayos convencionales en el área aislada para este estudio.

  - Habrá un estricto control de plagas y malezas en el área del ensayo.

  - Si bien el polen de trigo no es dispersado por agentes vectores (ver documento de soporte "The Biology of Triticum aestivum L. em Thell. –Bread Wheat), la presencia de animales pequeños como ratones será controlada con cebos tóxicos. Durante la época en que los

granos pudieran atraer a los pájaros se tomarán medidas de control como la cobertura con mallas para limitar el acceso de las aves.

- Durante el periodo de floración, todo el personal utilizará ropa especial (batas) dentro del área experimental. Las batas serán colocadas en bolsas plásticas cerradas al finalizarse las tareas de campo.

- Luego de la cosecha, todo el área será irrigada para favorecer la germinación de semillas que puedan haber caído en forma natural. Las plantas que emergieran serán eliminadas por quema.

- El área experimental estará identificada con letreros que indiquen la siembra de productos transgénicos y que éstos no son utilizados para el consumo humano o animal.

- El área se encuentra cercada y con seguridad. Sólo el personal autorizado tendrá acceso. Todo el personal que trabaje en este ensayo recibirá la capacitación necesaria para comprender las normas de seguridad e importancia de las mismas y comprometerse a su cumplimiento.

IV. b. 5. Medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado.

Una posible liberación accidental no ocasionaría riesgos a la salud humana o ambiental. El gen introducido ocurre naturalmente en muchas especies vegetales. La única diferencia entre los trigos transgénicos y los trigos convencionales es en el nivel de expresión o en el momento de expresión de los productos que normalmente regula el gen. Véase también los Análisis de Riesgos presentados como anexos.

Estudios recientes no encontraron efectos negativos en larvas de insectos y áfidos que fueran alimentados con trigos genéticamente modificados (Peter *et al.,* 2010; von Burg *et al.,* 2010). Los estudios con larvas de moscas se llevaron a cabo por científicos del Instituto de Ecología y Evolución de la Universidad de Bern, Suiza. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de trigos transgénicos sobre las larvas de moscas que descomponen residuos en el suelo, y por lo tanto, asociadas a la fertilidad del suelo. En este estudio se alimentaron larvas de moscas de dos especies con hojas de seis diferentes trigos genéticamente modificados. Otro grupo de larvas se alimentó con trigos convencionales, con fines comparativos. Luego se observó el desarrollo y reproducción de las moscas que emergieron de estas larvas, por un periodo de cuatro generaciones para ver si ocurrían efectos a largo plazo. La dieta no tuvo efectos sobre estos individuos en ninguno de los casos. Un enfoque similar fue realizado en el Instituto de Biología Evolutiva y Ciencias Ambientales de la Universidad de Zurich, Suiza, donde treinta colonias de áfidos fueron alimentadas con ocho trigos, cuatro de los cuales eran genéticamente modificados. Se registró la mortalidad, peso y fertilidad de los áfidos. Nuevamente, no se observaron efectos debidos a la ingesta de trigos genéticamente modificados.

IV. b. 6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación.

- Cosecha de materiales:

- Cosecha de biomasas

Las biomasas cosechadas (cortes de tallos y hojas, y muestreo de raíces) se trasladarán en bolsas cerradas e identificadas, se procesarán, y secarán completamente en estufa a 75C. Estas muestras no

contendrán espigas maduras o semillas, las cuales serán separadas de las plantas al momento del muestreo.

- Semillas o espigas de plantas transgénicas cosechadas

Un funcionario de bioseguridad del CIMMYT y autoridades de los organismos fitosanitarios de control estarán presente durante la cosecha con el fin de asegurarse de que toda la semilla o espigas se prepare en la forma descrita para el traslado, que contempla el correcto etiquetado, empaque, inventario y control de salida y llegada del material. Estas semillas o espigas se enviarán al Laboratorio de Bioseguridad en la sede del CIMMYT, El Batán, Texcoco, Estado de México, según el protocolo de traslado terrestre descripto. Ya en la institución, todo el material acompañante será esterilizado utilizándose una autoclave disponible en el área de bioseguridad. La semilla será almacenada en la zona de bioseguridad destinada a tal fin.

En caso de accidente durante el transporte se procederá a la recolección manual del material o quema del mismo en el lugar del accidente si no fuera posible su total recolección. Inmediato al accidente se informará a las autoridades de Bioseguridad de CIMMYT y de los organismos fitosanitarios de control. La zona del accidente será identificada y monitoreada por la presencia de trigos transgénicos.





- Material de campo

Se procederá a la destrucción de todo material que no se utilice para posteriores siembras o para análisis mediante quema, en el mismo lote donde se sembró el ensayo.
Si existieran materiales que fuera necesario conservar para posteriores experimentos se procederá a la esterilización de los mismos mediante autoclave ubicada en las instalaciones del CIMMYT.



V. Antecedentes de liberación del OGM en otros países, cuando esto se haya realizado, debiendo anexar la información pertinente cuando ésta se encuentre al alcance del promovente:

V. a) Descripción de la zona en donde se realizó la liberación.

No aplica

V. b) Efectos de la liberación sobre la flora y la fauna.

No aplica

V. c) Estudio de los posibles riesgos de la liberación de los OGMs presentado en el país de origen, cuando haya sido requerido por la autoridad de otro país y se tenga acceso a él. La descripción de las medidas y procedimientos de monitoreo de bioseguridad establecidos deberá incluirse en el estudio.

No aplica

V. d) En caso de que el promovente lo considere adecuado, otros estudios o consideraciones en los que se analicen tanto la contribución del OGM a la solución de problemas ambientales, sociales, productivos o de otra índole, así como las consideraciones socioeconómicas que existan respecto de la liberación de OGMs al ambiente. Estos análisis deberán estar sustentados en evidencias científicas y técnicas, en los antecedentes sobre uso, producción y consumo, y podrán ser considerados por las Secretarías competentes como elementos adicionales para decidir sobre la liberación experimental al ambiente, y consecuentes liberaciones al ambiente en programa piloto y comercial, respectivamente, del OGM de que se trata.

No aplica

V. e) En caso de importación copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM está permitido conforme a la legislación del país de origen, al menos para su liberación experimental, traducida al español. La Secretaría competente, de considerarlo necesario, podrá requerir copia simple de la legislación aplicable vigente en el país de exportación traducida al español.

No aplica.

VI. Consideraciones sobre los riesgos de las alternativas tecnológicas con que se cuente para contender con el problema para el cual se construyó el OGM, en caso de que tales alternativas existan;

No aplica.

VII. Número de autorización expedida por SALUD cuando el OGM tenga finalidades de salud pública o se destine a la biorremediación. En caso de no contar con la autorización al momento de presentar la solicitud de permiso, el promovente podrá presentarla posteriormente anexa a un escrito libre, en el que se indique el número de autorización;

No aplica.
El trigo transgénico no será utilizado para consumo animal ni humano.

VIII. La propuesta de vigencia para el permiso y los elementos empleados para determinarla

Se solicita la vigencia del permiso durante una estación de crecimiento del cultivo de trigo.

El tiempo desde la siembra a madurez es de 130 días aproximadamente. El tiempo de germinación-emergencia es de 5-6 días, estado vegetativo 35-45 días, la formación de órganos florales se observa a 60-70 días desde la emergencia y el llenado de granos-madurez a los 130 días desde la emergencia.

INFORMACIÓN ADICIONAL

Cantidad de semilla a movilizar (importar), la ruta, las medidas de bioseguridad y condiciones de manejo durante el transporte.

Se propone movilizar un **máximo de 2500 gramos de semilla** de este evento modificado.

Se desea incluir en el mismo ensayo experimental eventos transformados con diferentes combinaciones de genes y promotores, a fin de determinar la combinación gen-promotor más exitosa en la respuesta al estrés hídrico. Dado que cada combinación requiere un permiso de siembra independiente, el diseño de siembra y cantidad exacta de semilla a movilizar estará en función de la cantidad de eventos que reciban la aprobación para ser incluidos en el ensayo. Por ello, se solicita este permiso para un máximo de 2500 gramos de semilla, cantidad que se solicita poder ajustar al momento de conocer el número total de eventos transgénicos que obtuvieron el permiso para su inclusión en el ensayo experimental.

El diseño experimental que se llevará a cabo durante la liberación en fase experimental.

1- Propósito de los experimentos

El objetivo del ensayo es obtener una caracterización fisiológica completa y evaluar la tolerancia a la sequía en diferentes etapas de desarrollo de las líneas transgénicas en comparación con plantas de trigo controles no transformadas. También se desea conocer la habilidad de las plantas transgénicas para acceder al agua en los perfiles profundos del suelo.

2- Diseño experimental propuesto

Cada uno de los transgénicos se sembrará en parcelas (unidad experimental) en camas separadas 0.75 m. Cada cama consta de dos hileras de trigo, separadas 18 cm. El diseño experimental será alfa-látice.

Para parcelas grandes (3 m^2) se utilizarán 15 g de semilla por cama (30 g por parcela de dos camas). La cantidad de semilla podrá modificarse para ajustar la densidad de siembra según el peso de mil granos y poder germinativo de cada entrada. Asimismo, se utilizan ~5 gramos de semilla por parcelas chicas (0.75 m^2), y ~20 semillas en las siembras de golpes (parcelas separadas 50 cm).

3- Parámetros que se propone determinar:

Cobertura, temperatura del dosel, porometría y fotosíntesis, acumulación de carbohidratos en tallos, contenido de clorofila (SPAD), ceras, pubescencia y enrollamiento de hojas, extracción de agua en distintos perfiles del suelo, discriminación en el uso del carbono, fenología, biomasa (aérea y radical), rendimiento, componentes del rendimiento (espiguillas por espiga, granos por espiga, peso del grano, y densidad de espigas).

Documentos de soporte

Bae, T. W., E. Vanjildorj, S. Y. Song, S. Nishiguchi, S. S. Yang, I. J. Song, T. Chandrasekhar, T. W. Kang, J. I. Kim, Y. J. Koh, S. Y. Park, J. Lee, Y.-E. Lee, K. H. Ryu, K. Z. Riu, P.-S. Song, H. Y. Lee. 2008. Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. J. Environ. Qual. 37: 207-218.

Dubcovsky J., J. Dvorak. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science 316 (5833): 1862-1866.

Hegde S. G., J. G. Waines. 2004. Hybridization and introgression between bread wheat and wild and weedy relatives in North America. Crop Sci. 44: 1145-1155.

Miroshnichenko D., M. Filippov, S. Dolgov. 2007. Genetic transformation of Russian wheat cultivars. Agriculture and Environment Biotechnology, Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 21/2007/4, 399-402.

Office of the Gene Technology Regulator - Australian Government Office of the Gene Technology Regulator. http://www.ogtr.gov.au The Biology of *Triticum aestivum* L. em Thell. (Bread Wheat).

Peter M., A. Lindfeld, W. Nentwig. 2010. Does GM wheat affect saprophagous *Diptera* species (*Drosophilidae, Phoridae*)?, Pedobiologia. In Press, Corrected Proof, Available online 14 January 2010, ISSN 0031-4056, DOI: 10.1016/j.pedobi.2009.12.006.
(http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CW5-4Y5BMG2-1/2/ced216d7f61a3142484387ea8fa2bd36)

von Burg S., C. B. Müller, J. Romeis, J. 2010. Transgenic disease-resistant wheat does not affect the clonal performance of the aphid *Metolophium dirhodum* Walker. Basic and Applied Ecology. In Press, Corrected Proof, Available online 6 March 2010, ISSN 1439-1791, DOI: 10.1016/j.baae.2010.02.003.
(http://www.sciencedirect.com/science/article/B7GVS-4YJ6N5D-2/2/bb33651f220175c6917a30c6ca1ccf76)

Waines J. G., S. G. Hegde. 2003. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. Crop Sci. 43: 451-463.

Zaharieva M., P. Monneveux. 2006. Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. Crop Sci. 46: 512-527.

Otros documentos:

Estados Unidos
http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/index.shtml
http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/brs_main.shtml

Comunidad Europea –
Deliberate release into the environment of GMOs
http://gmoinfo.jrc.it/gmp_browse.aspx

Canadá-
http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/confine.shtml#sum
http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dt/term/2005/triaeste.shtml

Australia-
The Biology of *Triticum aestivum* L. em Thell. (Bread Wheat) – Documento adjunto como anexo.
Office of the Gene Technology Regulator - Australian Government Office of the Gene Technology Regulator. <http://www.ogtr.gov.au>
http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/wheat-4/$FILE/biologywheat08.rtf

Anexos

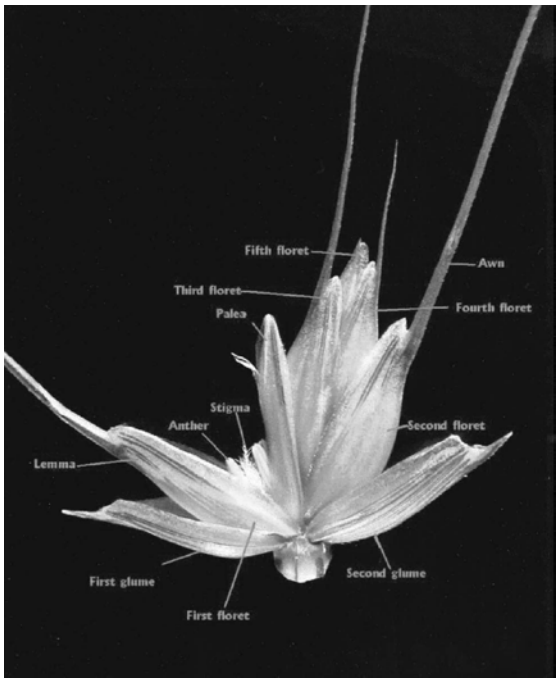
Características de las plantas de trigo.

El trigo es un cultivo autógamo anual.
La floración comienza en el centro de la espiga y se extiende hacia el ápice y la base, demorando cada espiga unos 3-5 días en llegar a floración total. El color de las anteras fuera de la espiguilla delata el tiempo transcurrido desde su emergencia, ni bien emergen son de color amarillo y se ven hidratadas, al tiempo se ponen más claras y secas. Hay genotipos en los que no emergen las anteras, fenómeno que se magnifica cuando las parcelas se encuentran sometidas a estrés hídrico o por calor.
Cada tallo produce una inflorescencia (espiga). La unidad básica de la espiga es la espiguilla, dentro de la cual se encuentran las flores especializadas típicas de las gramíneas. Los estambres de trigo son pequeños y producen menos granos de polen (1.000 a 3.800 por antera) que la mayoría de los otros cereales. Sólo se producen unos 450.000 por planta, en comparación, por ejemplo, con alrededor de 4 millones y 8 millones por planta en el caso del centeno (*Secale cereale* L) y el maíz, respectivamente.
Los estigmas son receptivos dentro de los primeros 4 a 13 días, pero el polen sólo es viable hasta 30 minutos en condiciones óptimas. El trigo normalmente se autopoliniza. Cuando emergen los estigmas, por lo general las estructuras femeninas de dicha planta ya están polinizados (autofecundación). Los granos de polen se desecan rápidamente después de ser liberados de las anteras.
La flor del trigo presenta un color y forma no atractivo para insectos o aves, sin fragancia, sin néctar, con producción de polen restringida comparado con otras especies. Esto la hace no atractiva para polinizadores.
El viento es el principal dispersor del grano de polen de trigo, sin embargo, la baja cantidad de polen producida, la baja viabilidad, y el relativamente mayor peso del grano del trigo comparado con otros cereales limitan las posibilidades de dispersión.
Bajo condiciones óptimas (20 C, 60 % HR) el polen mantiene la viabilidad por aproximadamente media hora.
La semilla es la única estructura de propagación en la planta de trigo. Por lo general, las semillas de trigo son capaces de germinar inmediatamente después de llegada la madurez de la planta.
Si bien las semillas pueden permanecer en el suelo sin germinar, la mayoría de las veces germinan al presentarse condiciones favorables de temperatura y humedad en el suelo.

Espigas de trigo. Secuencia desde embuche a floración.
Cuando las anteras aparecen son de color amarillo brillante pero se deshidratan y decoloran en pocas horas cuando quedan expuestas al sol. En algunos casos las espigas no muestran las anteras.



Espiguilla de trigo. La primera flor –izquierda- está abierta, mostrándose las 3 anteras y una porción del estigma receptivo.



Flor del trigo. En la siguiente figura podemos ver a la izquierda una flor donde sus anteras aun no han madurado, a la derecha las anteras cambian de color verde a amarillo y están listas para liberar polen. An = antera; Ld = lodícula; fs= estigma plumoso (receptivo).



Fuente de las fotografías:
- Waines y Hegde, 2003, Crop Science 43:451-463.
- http://www.wheatbp.net/