CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA GENETICA
UNIDAD IRAPUATO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA,
CIUDAD DE MEXICO

SOLICITUD DE PERMISO EXPERIMENTAL DE MAIZ TOLERANTE A SEQUIA Y FRIO

Versión con información pública

Presentan:
Dres. José Luis Cabrera Ponce, Roberto Ruiz Medrano y Beatriz Xoconostle Cázares.

Resumen

El cultivo de maíz presenta diversos problemas, entre los que destaca la falta de variedades tolerantes a sequía y frío. En la presente solicitud de permiso para liberación en fase experimental, se describe maíz B73 cisgénico, denominado CIEA-9, tolerante a sequía y frío. La procedencia de la semilla es la ciudad de Irapuato, Guanajuato y se solicita permiso para los ciclos agrícolas OI-2011 y PV-2012.

El propósito de la liberación al ambiente es evaluar la respuesta de maíz B73 genéticamente modificado con tolerancia a sequía y frío en campo. Esta siembra nos permitirá cuantificar la respuesta mejorada a estrés abiótico de maíz y poder comparar los datos ya obtenidos de tolerancia a sequía que se han realizado de manera confinada en nuestras instalaciones.

México D.F. a 12 de abril, 2011.

Órgano de la secretaría competente al que se dirige la solicitud

De acuerdo al artículo 12 fracción I de la LBOGM la autoridad competente responsable de la emisión del permiso solicitado es la SAGARPA, quién ante el Registro Federal de trámites de la Comisión Federal de la Mejora Regulatoria registró como responsable del trámite a la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

Guillermo Pérez Valenzuela 127, Edificio Principal, Planta Baja
Colonia del Carmen Coyoacán
CP 04100, México, D.F.

REQUISITOS

I. Nombre de los Investigadores autorizados:

Dr. José Luis Cabrera Ponce, Departamento de Ingeniería Genética, Cinvestav Irapuato. 36500 Irapuato Gto. (462)62-39600. jlcabre@ira.cinvestav.mx

Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav Zacatenco, 07360 México D.F. (55)5747-3318. bxoconos@cinvestav.mx

Dr. Roberto Ruiz Medrano, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav Zacatenco, 07360 México D.F. (55)5747-3318. rmedrano@cinvestav.mx

II. Domicilio para oír y recibir notificaciones:

- Laboratorio de Biología Molecular de Plantas
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV Zacatenco
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 México D.F.

- Laboratorio de Transformación Genética de Plantas
Departamento de Ingeniería Genética
CINVESTAV Irapuato
Km. 9.6 carr. Libramiento Nte. Irapuato-León
36500 Irapuato Guanajuato.

DATOS DEL OGM

Organismo: Zea mays L.

Nombre común: Maíz

Evento: Tolerancia a sequía.

Origen o procedencia de la semilla: Cinvestav Irapuato, Gto.

Sitios de liberación propuestos: Concordia, Sinaloa.

Número de hectáreas solicitadas: Cuatro.

Cantidad de semilla a importar: No necesita importarse, ya que se generó en nuestro laboratorio de investigación ubicado en territorio mexicano.

Fenotipo adquirido: Tolerancia a sequía y frío.

Nombre comercial: CIEA-9.

Objetivo y propósito de la liberación al ambiente: El objetivo general de la siembra experimental es evaluar la respuesta de maíz B73 genéticamente modificado con tolerancia a sequía y frío. Esta siembra nos permitirá cuantificar la respuesta en campo a sequía de maíz y poder comparar los datos ya obtenidos de tolerancia a sequía que se han realizado de manera confinada en nuestras instalaciones.

Tolerancia a sequía en variedades de maíz

El maíz es el tercer cereal en importancia a escala mundial y junto con el arroz y el trigo proporciona el 60% de las calorías y las proteínas de la dieta promedio. Los rendimientos del maíz en el mundo desarrollado promedian las 8,2 t/ha mientras que en las zonas tropicales menos desarrolladas oscilan en 3,5 t/ha. En ambos ambientes de producción la sequía es el estrés abiótico más importante, limitando y desestabilizando la producción ya que se producen déficits de agua impredecibles durante el ciclo del cultivo. La variabilidad del suelo también afecta la disponibilidad de agua para las plantas y de la misma pueden resultar variaciones del rendimiento de hasta 10 veces en una campaña relativamente seca (Rossi, 2009).

La mayoría de las 160 millones de hectáreas cultivadas con maíz a nivel mundial se hacen en secano y el déficit hídrico genera pérdidas anuales promedio de un 15% de la producción potencial. La escasez de agua constituye una limitación significativa para el rendimiento en el cinturón del maíz de los EE.UU. en el 20% de los años y las pérdidas serían mayores en los países tropicales que presentan una distribución de lluvias menos uniforme durante el ciclo del cultivo.

Asimismo, la variabilidad de las precipitaciones puede incrementarse como consecuencia de los efectos del cambio climático. A medida que aumenten las temperaturas y los patrones de precipitación cambien, las pérdidas adicionales de maíz pueden acercarse a 10 millones de toneladas por año. Cultivos tolerantes a la sequía y el calor desempeñarán un papel cada vez más importante en la adaptación a esta variación y, a largo plazo, frente a la tendencia hacia un ambiente de producción más caliente y probablemente más seco. Además, la difusión de cultivares resistentes a estreses abióticos podría permitir el uso y la recuperación de tierras afectadas por salinidad, acidez, desertificación, etc.

Como estimación empírica, alrededor del 25% de las pérdidas atribuidas a la sequía podrían ser superadas por el mejoramiento genético de la tolerancia, otro 25% mediante la aplicación de prácticas agronómicas de manejo del agua, mientras que el 50% restante sólo podrían ser evitadas a través del riego. Sin embargo, las perspectivas de adición de mayor superficie regada para el cultivo de maíz son reducidas, ya que se prevé que el área total de regadío aumente a un ritmo similar o inferior a la tasa de crecimiento demográfico. El crecimiento de la superficie de riego se dará mayormente en

Asia, y será dedicada a cultivos de mayor valor. Además, la agricultura ya utiliza más del 70% del agua dulce consumida a nivel global y su disponibilidad probablemente irá disminuyendo en tanto que la población mundial pasará de los actuales 6,7 a más de 9 millones de habitantes en 2050. Mientras las personas beben de 1 a 3 litros por día, los alimentos diarios requieren entre 2.000 y 3.000 litros para ser producidos. Visto la escasez de agua y su papel crucial en la salud y la agricultura, su uso más eficiente y la tolerancia a la sequía tienen prioridad creciente a medida que se intensifica la competencia por el agua entre las personas y los cultivos. Por lo tanto, para incrementar la producción de granos será necesario recurrir a zonas marginales propensas al déficit hídrico, tanto en las regiones templadas como en las tropicales.Por otra parte, África tiene más de 900 millones de habitantes que representan el 14% de la población mundial, y es el único continente donde la producción de alimentos per cápita está en descenso. Al menos una tercera parte de la población padece hambre y malnutrición y el maíz es un alimento básico para más de 300 millones de personas, particularmente en el África subsahariana. Varios países de esa región a menudo experimentan déficit hídrico en la misma campaña, generando escasez de alimentos a nivel regional que no puede aliviarse por el comercio transfronterizo. El incremento de los precios de los granos y fertilizantes, asociados a la creciente demanda de granos para biocombustibles, agrava aún más el problema. De allí que el maíz tolerante a la sequía podría desempeñar un papel crucial en el cumplimiento de los “Objetivos de Desarrollo del Milenio” de reducir a la mitad para 2015 la proporción de personas que padecen hambre y pobreza extrema. No obstante, las inversiones públicas en agrobiotecnología deberían acompañarse de políticas que fomenten el desarrollo de sistemas de semillas que permitan a los agricultores aprovechar las nuevas tecnologías a través del acceso a cultivares mejorados y adecuada información sobre los productos. México tiene también una necesidad apremiante de variedades con mejor productividad y tolerancia a estrés abiótico.

Alternativas para encarar el problema

En el cultivo de maíz se vienen realizando fuertes inversiones para aumentar su productividad a través de tres estrategias complementarias: el manejo del cultivo, la

generación de híbridos por cruzas convencionales y el mejoramiento via ingeniería genética.

Modalidad de la liberación solicitada y las razones de la petición

Se solicita la autorización de la siembra experimental de maíz genéticamente modificado CIEA-9 en campos agrícolas del municipio de Concordia, Sinaloa, con nuestra supervisión y de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en el ciclo agrícola Otoño-Invierno del 2011 y Primavera-Verano 2012. La fecha de siembra que se propone tiene un mes de retraso con respecto al inicio de siembra primavera-verano, con el fin de establecer una barrera temporal de este cultivo experimental con el posible cultivo de especies sexualmente compatibles. Como se detallará adelante, se incluirá una barrera biológica y la siembra estará al menos distanciada por 400 metros de otros cultivos sexualmente compatibles.

Objetivos

El objetivo general de la siembra experimental es evaluar la respuesta de maíz B73 genéticamente modificado con tolerancia a sequía. Esta siembra nos permitirá cuantificar la respuesta mejorada a sequía de maíz y poder comparar los datos ya obtenidos de tolerancia a sequía que se han realizado de manera confinada en nuestras instalaciones.

Los experimentos consistirán de la siembra de maíz B73 Tre y se evaluará la tolerancia a sequía en la fase vegetativa, fase de floración y llenado de grano. La densidad de siembra será de baja densidad para poder valorar la respuesta fisiológica y molecular de las plantas al estrés hídrico. Asimismo, se crecerá maíz criollo y se evaluará su crecimiento con el objeto de identificar posibles variaciones en la fenología del maíz.

Los objetivos particulares de la presente solicitud son:

1. Evaluar la respuesta fisiológica en campo de maíz bajo estrés hídrico en sequía intermedia y severa.
2. Evaluación de la actividad fotosintética de las plantas bajo estrés y en condiciones de humedad.

3. Evaluar la respuesta molecular a sequía de genes que se sobreexpresan en campo abierto en el cultivo de maíz a través de un macroarreglo de genes de respuesta a sequía.
4. Comparar la respuesta fisiológica y molecular bajo estrés y con aporte de agua tanto en condiciones confinadas de crecimiento y en el campo experimental.
5. Evaluar posibles condiciones de estrés abiótico en campo como respuesta a frío.
6. Evaluar el desarrollo de material criollo creciendo con maíz genéticamente modificado.

Mediciones a realizar en campo para maíz CIEA-9, B73 y criollo

Medición agronómica en crecimiento vegetativo:

Porcentaje de germinación

Cinética de la talla de hoja bandera y altura de la planta

Estimación del contenido relativo de agua en suelo y hoja

Cuantificación no destructiva de apertura estomática, conductividad, fotosíntesis y transpiración a 2500 y 3000 luxes.

Medición agronómica en plantas en floración:

Aparición de espigas

Aparición de flores femeninas y número

Estimación del contenido relativo de agua en suelo y hoja

Cuantificación no destructiva de apertura estomática, conductividad, fotosíntesis y transpiración a 2500 y 3000 luxes.

Muestreo para realizar en laboratorio

Estabilidad de cisgen en campo: Southern blot de muestra de plantas

Expresión del cisgen: RT-PCR cuantitativo (tiempo real)

Contenido de trehalasa en hoja

Cosecha:

Estimación de peso fresco

Secado de grano por exposición solar

Estimación del peso de mazorca, longitud.

Desgranado, peso de semilla, numero de semillas.

Diseño experimental en la parcela experimental

Abajo se indican las dimensiones de la siembra:

Distancia entre surcos: 1 metro

Largo del surco: 20 metros

Distancia entre plantas: 25 centímetros

REQUISITOS

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

1. a. Identificador único del evento de transformación

Maiz CIEA-9

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

El organismo receptor es la planta de maíz Zea mays. El maíz es una especie diploide con un número cromosómico de 2n=2x=20.

Nombre científico y clasificación taxonómica del maíz

El maíz es miembro de la tribu Maydeae, que está incluida en la subfamilia Panicoideae de la familia Gramineae. Los géneros incluidos en la tribu Maydeae comprenden a *Zea* y *Tripsacum* en el Hemisferio Occidental y *Coix*, *Polytoca, Chionachne, Schlerachne* y *Trilobachne* en Asia. Aunque los géneros asiáticos han sido sugeridos por algunos como los originarios del maíz, la evidencia no es extensiva ni convincente como la de los géneros localizados en el Hemisferio Occidental (Doebley 1990; Benz, 2001).

Se han presentado algunas variaciones en las designaciones latinas binomiales de las especies incluidas en el género *Zea* (Doebley y Iltis, 1980). El género *Zea* incluye a dos subgéneros: *Luxuriantes y Zea*. El maíz (*Zea mays* L.) es una especie separada dentro del subgénero *Zea* junto con sus tres subespecies. Todas las especies dentro del género *Zea*, excepto el maíz, son especies diferentes de teocintles. Hasta recientemente, las especies de teocintles fueron incluidas en el género *Euchlaena* en lugar del género *Zea*. Un segundo género incluido en la tribu Maydeae es *Tripsacum*. *Tripsacum* con 16 especies y 18 cromosomas (n= 18). Las diferentes especies de *Tripsacum* incluyen múltiplos de 18 cromosomas, que van de 2n = 36 hasta 2n = 108.

Se incluyen 5 géneros en la tribu Maydeae de origen asiático. Con la excepción de *Coix*, el número cromosómico base es n= 10. Dentro del género *Coix* se han reportado valores n= 5 y n= 10.

Organismos genéticamente relacionados a maíz

Teocintles

El organismo silvestre más cercano al maíz es el teocintle, perteneciente al género Zea. El teocintle es mesoamericano, nativo de México y América Central y presenta distribución muy limitada (Mangelsdorf et al. 1981). Las especies de teocintles muestran muy poca tendencia a colonizar otras áreas más allá de su distribución natural y se restringen a México y Centroamérica. No se ha reportado su presencia en el Sureste asiático (Watson & Dallwitz 1992). Las especies descritas son: *Zea diploperenni, Zea perennis, Zea mays mexicana, Zea mays parviglumis.* En estas especies la semilla madura se escinde de la región apical de la planta, pero no es capaz de dispersarse por medios naturales tales como viento, debido a su peso específico.

Tripsacum

Los parientes silvestres más cercanos al maíz fuera del género Zea son los integrantes del género *Tripsacum,* de hábito perenne. El género *Tripsacum* comprende 12 especies, principalmente nativas de México y Guatemala, pero ampliamente distribuidas en las regiones cálidas de los Estados Unidos y América del Sur, con algunas especies presentes en Asia y el sureste asiático (Watson & Dallwitz, 1992). Debido a su amplio crecimiento vegetativo abundante en primavera y verano se consideran como pastos naturales. México es un país megadiverso y está ubicado en tercer lugar a nivel mundial en diversidad biológica; posee el 10% de la flora del mundo, aproximadamente 30,000 especies de plantas, de las cuales 21,600 —agrupadas en 2,500 géneros— son fanerógamas (Rzedowski, 1993). Una de las características más importantes de la diversidad florística de México es que el 12% de los géneros y 50-60% de todas sus especies son endémicas; es decir, su distribución está restringida al territorio nacional; este es el caso de algunas especies de teocintle (Zea spp.).

Los parientes silvestres del maíz llamados colectivamente teocintles están representados por especies anuales y perennes diploides (2n = 20) y por una especie tetraploide (2n = 40); se encuentran dentro de las áreas tropicales y subtropicales de

México, Guatemala, Honduras y Nicaragua, ocurriendo como poblaciones aisladas de tamaños variables que ocupan desde menos de uno hasta varios cientos de km2 . Al teocintle, considerado el pariente más cercano del maíz, algunos autores le han atribuido una gran influencia en el incremento de la variabilidad y la formación de las principales razas de maíz en México (Wellhausen et al., 1951; Mangelsdorf y Reeves, 1959; Mangelsdorf, 1974; 1986; Wilkes, 1979), debido entre otras razones al sistema de reproducción que permite la hibridación natural en ambos sentidos, lo cual hace posible un constante flujo de genes (Wilkes, 1970; 1977a; Benz et al., 1990). Por su parte, otros investigadores han indicado que al parecer no hay introgresión (Kato, 1984) entre el maíz y el teocintle en ambos sentidos, o es muy reducida (Doebley, 1990a; 1990b) y no se sabe con precisión hasta qué punto el teocintle ha participado en la formación de las razas de maíz en México.

Distribución del teocintle

La distribución del teocintle en México se extiende desde la porción sur de la región cultural conocida como Aridamérica, en la Sierra Madre Occidental del estado de Chihuahua y Valle de Guadiana en Durango, hasta la frontera con Guatemala incluyendo prácticamente toda la porción occidental de Mesoamérica. En las diferentes regiones de México existen poblaciones de teocintle con características morfológicas y genéticas que permiten su diferenciación. Un aspecto que cabe resaltar en relación con la distribución geográfica de teocintle, es que las poblaciones no tienen una distribución uniforme, sino que hay condiciones específicas de clima, suelo e influencia humana, donde es posible localizarlas. De manera interesante, su origen se ha sugerido en la sierra madre transversal, donde prolifera extensamente. Coincidentemente, el origen del frijol también se ha mapeado en esa región mediante el uso de marcadores moleculares (Paul Gepts, comunicación personal).

Distribución en México

Se ha registrado en Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán (Dávila et al., 2006), Nayarit, Colima y Oaxaca.

Sánchez y Ruiz-Corral (1996) publicaron un extenso análisis de la distribución en México, donde debe notarse la carencia de teocintle y especies relacionadas en Sinaloa

y Sonora, México; siendo en Sinaloa donde se solicita el permiso de siembra experimental.

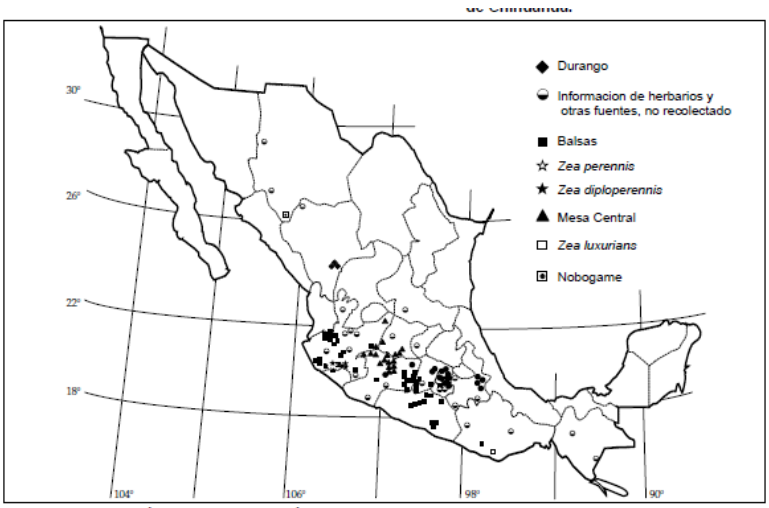

Figura 1. Distribución de teocintle en México.

Figura 1. Distribución de Teocintle en México. Tomado de Sánchez y Ruiz Corral, 1996.

Los tres géneros de la tribu Maydeae en América son: *Zea, Euchlaena y Tripsacum.* Estos grupos han sido estudiados exhaustivamente para clarificar el origen del maíz. Como muchos pastos, los Tripsaceae son polinizados por el viento. Una característica distintiva de los miembros americanos es que son monoicos, es decir, las flores masculinas y femeninas nacen de forma separada en la misma planta. En el teocintle (*Zea ssp*.) y en el gamagrass *Tripsacum*, el grano nace dentro de una cariópsida compuesta por dos glumas endurecidas. Generalmente, hay de cinco a nueve semillas por fructificación, que libera las semillas al madurar por un sistema de dispersión natural. Una diferencia distintiva entre *Zea y Tripsacum* es que en primero, las flores masculinas (estaminadas) se producen en la misma inflorescencia (la espiga) que aparece en la punta del tallos y las flores femeninas (pistiladas) usualmente se desarrollan de forma separada en las ramas laterales (Eubanks, 2001). Por otro lado, en *Tripsacum* las flores masculinas usualmente nacen directamente sobre las flores femeninas en la misma estructura. El *Tripsacum* no se cruza en la naturaleza con el maíz cultivado, ni con el teocintle (Eubanks, 2001). Adicionalmente, si se llegan a formar híbridos artificiales, un gran porcentaje de las semillas serán estériles. Esto se debe principalmente a la diferencia en el número de cromosomas entre el maíz y el *Tripsacum*. La mayoría de las

especies de *Tripsacum* tienen entre n=18, 36, 72 o 180 cromosomas comparados con n=10 del maíz (Eubanks, 2001).

1. c. Existencia de especies sexualmente compatibles.

La localidad propuesta para el ensayo experimental es el municipio de Concordia, Sinaloa, el cual no tiene presencia de plantas genéticamente compatibles. El predio de referencia fue sugerido por tener las siguientes características:

i) Capacidad del área para sembrar maíz y que el productor utilice cualquier otro cultivo incompatible sexualmente, dentro de la distancia de aislamiento propuesta de 600 metros perimetrales.

ii) En la zona no se cultivan razas o materiales criollos. Como se indicó en el apartado 1b.

iii) Carecer de teocintle.

A continuación se describe las posibilidades de introgresión si existiera material vegetal sexualmente compatible.

Polinización y polinizadores del cultivo

Polinización anemófila

El movimiento de polen es el único medio efectivo para que se realicen cruzas genéticas a través de la polinización cruzada y por lo tanto, la introgresión en especies compatibles. El polen es liberado de las espigas desde la región apical de la planta y es transportado por el viento hacia las flores femeninas de la misma planta u otra, ubicadas en el tallo. La liberación de polen puede presentarse por un período de dos semanas con un pico máximo durante los primeros cinco días (Sears 2000). Los estigmas son receptivos durante gran parte de estas dos semanas (Kiesselbach, 1980). La velocidad y dirección del viento afectan la distribución del polen.

Polinización mediada por insectos

Se ha observado que insectos, tales como abejas, pueden colectar pasivamente polen de las espigas del maíz, pero no juegan un papel importante en la polinización dado que no existe un atrayente para visitar la flor femenina (Raynor et al. 1972).

Dispersión y dispersores

La dispersión solo se da mediante semillas. No habiendo dispersión natural a través de propagación vegetativa. La dispersión de semillas puede ser controlada fácilmente en maíz debido a que en el proceso de domesticación ha perdido los mecanismos de dispersión de semilla que el ancestro pudo haber tenido (Purseglove, 1972). En el maíz actual, los granos se mantienen firmemente unidos al olote y si una mazorca cae al suelo, la competencia entre las plántulas limita su crecimiento para poder llegar a la madurez (Gould, 1968). La utilización de un procedimiento mecánico de fuerza considerable debe ejercerse para separar a las semillas. De la misma manera, la herbivoría es un fenómeno que limita sustancialmente la vida media de una mazorca, siendo los principales organismos depredadores de larvas de insectos, roedores; además de poder ser atacado por hongos y bacterias fitopatógenas y saprofíticas. Esta herbivoría "inactiva" a la semilla, al destruir al embrión y/o al cotiledón del cual se alimentaría el primero durante el proceso de germinación.

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

Habitat: El maíz (Zea mays L. ssp. mays) se cultiva en todo el mundo, a latitudes que van desde la línea del Ecuador hasta un poco más allá de los 50 grados norte y sur, desde el nivel del mar hasta una altura mayor a 3.000 metros, en climas frescos y cálidos y con ciclos fenológicos que duran entre 3 a 13 meses (CIMMYT 2000). Es el tercer cultivo más importante en el mundo luego del arroz y el trigo, con una producción anual de 600 millones de toneladas en 1999 a 644 de toneladas en 2010 (FAO 2000, GCMA, 2010). El maíz presenta un amplio rango de distribución en nuestro país, pudiéndose identificar materiales adaptados a las diferentes regiones agroecológicas. Los híbridos modernos de maíz han sido desarrollados para expresar un potencial de rendimiento superior en sistemas de producción agrícola que incluyen la utilización de irrigación, fertilización y protección frente al ataque de plagas y enfermedades. Estas características los han convertido en una especie vulnerable a resistir estrés biótico y abiótico fuera del área determinada para su cultivo. Esto hecho se ha demostrado por la incapacidad de las semillas adventicias que son incapaces de crecer sin el aporte agua y

fertilizantes modernos, así como su susceptibilidad al ataque de depredadores, plagas y patógenos.

En México, la huella de agua para maíz se ha calculado en 13,000 litros de agua para poducir 1 kilogramo de semilla, considerando la productividad promedio de 6 toneladas métricas de maíz por hectárea.

En referencia al presente desarrollo biotecnológico, las plantas que son tolerantes a sequía son incapaces de crecer sin un aporte de fertilizante durante la fase exponencial de crecimiento vegetativo y durante el llenado de grano. Debido a que no cuentan con ninguna otra característica o marcador, son incapaces de mostrar otra resistencia tal como a herbicidas o insectos lepidópteros y coleópteros.

Por lo señalado arriba, esta línea pura genéticamente modificada no podrá persistir o proliferar.

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

Se introdujo una copia de un gen del mismo organismo Zea mays

El maíz que se modificó genéticamente pertenece a la línea pura B73, este es un maíz considerado como modelo para estudios de genética clásica y molecular. La secuenciación de su genoma ha permitido obtener valiosa información de su diversidad genética y biología del desarrollo. Asimismo, es utilizado para entender mecanismos de herencia mendeliana y citoplásmica en laboratorios en todo el mundo.

El maíz CIEA-9 es técnicamente un maíz cisgénico, al expresar en antisentido un segmento de DNA que codifica para la enzima trehalasa del propio maíz B73. La acumulación del disacárido trehalosa ha sido objeto de estudio en diversos organismos por su propiedad de conferir tolerancia a estrés hídrico, salino y temperaturas extremas. Al atenuar la expresión del gen de trehalasa por su propio mRNA antisentido, se permite la acumulación de la trehalosa. De esta manera, Este enfoque experimental permite que la planta mantenga un estatus hídrico superior al que tienen controles silvestres.

Organismo receptor

Clasificación taxonómica del maíz y especies relacionadas

Familia - Gramineae

Subfamilia - Panicoideae

Tribu - Maydeae

Hemisferio Occidental:

Género - *Zea*

A. Subgénero - Luxuriantes

1. Zea luxurians (2n = 20)

2. Zea perennis (2n = 40)

3. Zea diploperennis (2n = 20)

B. Subgénero - *Zea*

1. *Zea mays* (2n = 20)

Sub especies

1. *Z. mays parviglumis* (2n = 20)

2. *Z. mays huehuetenangensis* (2n = 20)

3. *Z. mays mexicana* (Schrad.) (2n = 20)

Género - *Tripsacum*

Especies con indicacion de su haploidía y número de cromosomas

T. andersomii (2n = 64); *T. latifolium* (2n = 36); *T. australe* (2n = 36); *T. peruvianum* (2n = 72, 90, 108); *T. bravum* (2n = 36, 72); *T. zopilotense* (2n = 36, 72); *T. cundinamarce* (2n = 36); *T. jalapense* (2n = 72); *T. dactyloides* (2n = 72) *T. lanceolatum* (2n = 72); *T. floridanum* (2n = 36); *T. fasciculatum* (2n = 36); *T. intermedium* (2n = 72); *T. maizar* (2n = 36, 72); *T. manisuroides* (2n = 72); *T. pilosum* (2n = 72).

Asia:

Géneros

Chionachne (2n = 20); *Schlerachne* (2n = 20); *Coix* (2n = 10, 20); *Trilobachne* (2n = 20); *Polytoca* (2n = 20). Tribu—Andropogoneae Género – *Manisuris*

1. **f. País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido**

Irapuato, Guanajuato, Distrito Federal, México,

1. g. Referencia documental sobre origen y diversificación maíz

En la actualidad existe consenso en la comunidad científica respecto a que la agricultura se originó en forma independiente en seis a ocho regiones del mundo.

Figura 2. México es el centro de origen, domesticación y diversificación de muchas plantas, animales, hongos y bacterias.

La evidencia paleontológica sugiere que la domesticación de plantas inició hace aproximadamente 10,000 años. Los registros arqueológicos de mayor antigüedad se han encontrado en México (Piperno y Flannery, 2001; Benz, 2001; Smith, 2001; Pope et al., 2001).

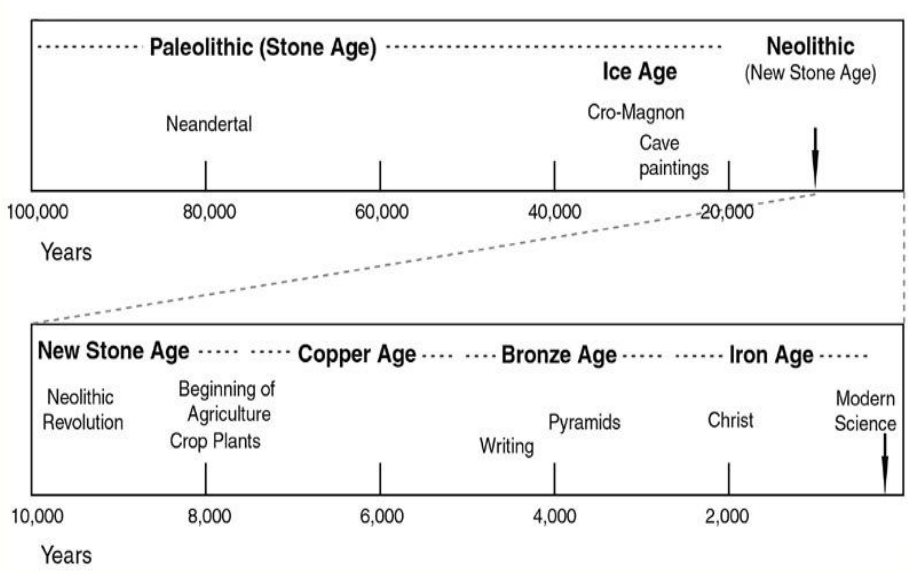

Figura 3. Escala de aparición de eventos en el desarrollo humano.

En la figura de arriba se esquematiza el desarrollo humano en función del tiempo desde la aparición de los primeros grupos de homínidos en el Paleolítico hasta el hombre moderno. Destaca la aparición del la nueva era de piedra con la aparición de la agricultura, hace 10,000 años.

Evolutivamente el maíz es considerado como el descendiente domesticado de una especie tropical de teocintle; datos de isoenzimas, microsatélites y secuencias de DNA apoyan la idea de que *Zea mays* ssp. *parviglumis* es el progenitor del maíz actual.

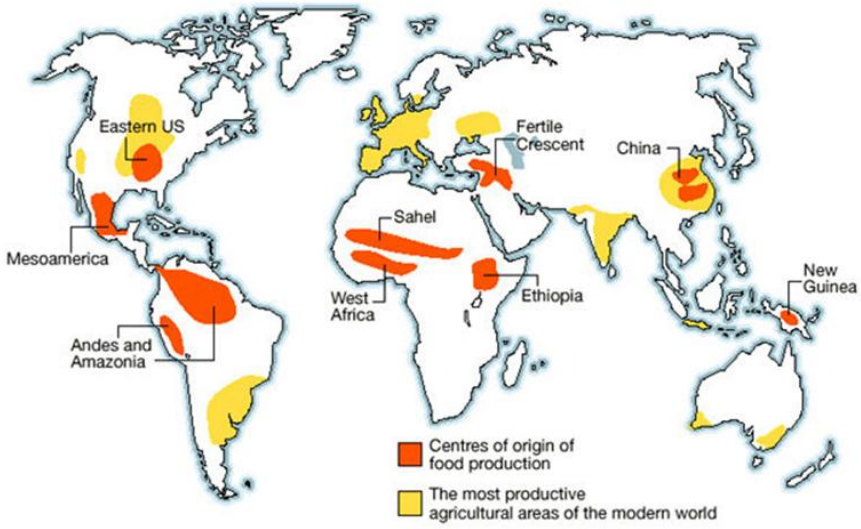

Figura 4. Origenes de la agricultura y centros modernos de producción.

Esta figura muestra los sitios conocidos como centro de origen en anaranjado, donde destaca Mesoamérica. Las áreas más productivas en la actualidad del palneta ya no son los centros de origen y diversidad. Los parientes silvestres del maíz conocidos colectivamente como teocintle están representados por especies anuales y por especies perennes diploides y tetraploides. La distribución del teocintle se encuentra restringida a áreas tropicales y subtropicales de México, Guatemala, Honduras y Nicaragua mayormente como poblaciones aisladas de tamaños variables; ocupando superficies de una hectárea hasta varios km^2. Wilkes (1967), describió cuatro razas de teocintles para México (Nobogame, Mesa Central, Chalco y Balsas) y dos para Guatemala (Guatemala y Huehuetenango); además se describió una nueva especie de teocintle para Nicaragua (Iltis y Benz, 2000).

Figura 5. Area probable de domesticación de maíz por evidencia genética. Modificado de www.plantsciences.ucdavis.edu/gepts

1. 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.

Caracterización molecular del gen de referencia

El marco abierto de lectura del gen que codifica para la enzima trehalasa de maíz B73 fue ligado a un segmento interno del gen en dirección antisentido. Posteriormente fue ligado a un promotor con sitios de restricción flanqueantes de la unidad de expresión. La transformación genética se realizó con esta unidad de expresión sin incluir otro elemento genético. La expresión antisentido no contiene ningún marco abierto en la otra orientación, por lo cual no se sintetiza ninguna proteína adicional en la planta genéticamente modificada. **O. Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos**

Como se ha descrito arriba, no existe síntesis de proteína nueva, además de utilizarse un gen endógeno de la misma planta. Asimismo, la atenuación de la expresión del gen que codifica para la trehalasa endógena provee de un fenotipo dominante, que es la resistencia o tolerancia a estrés hídrico. Considerando que la misma modificación fue usada como criterio de selección de las plantas tolerantes a sequía, no se empleó ningún gen adicional en la selección y regeneración de las plantas de referencia.

1.t. Referencias bibliográficas

- Guevara-Olvera, L.; **Xoconostle-Cázares, B.;** Ruiz-Herrera, J. Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of Ustilago maydis: evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. Microbiology (1997), **143,** 2237-2245**.**

- (1980). Descripción original de la subespecie Zea mays subsp. parviglumis. American Journal of Botany, Volumen 67.

- Aoki K, Kragler F, **Xoconostle-Cázares B**, Lucas WJ. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. Proc Natl Acad Sci U S A. 99:(2002) 16342-7.

- Barrera-Figueroa E, Pena-Castro J, Ruiz-Medrano R, **Xoconostle-Cazares B,** (2007) Isolation of dehydratation-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 LEA mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars. Functional Plant Biology 34:

- Basurto, Xoconostle y Álvarez Programación genética de plantas e insecticidas. Información Científica y Tecnológica, CONACyT. **12**:166-167 (1991) 66-72.

- Beatriz Xoconostle Cázares, Roberto Ruiz Medrano. Comunicación intercelular en plantas basada en macromoléculas (2000) Biotecnología 5: 1-5.

- Beatriz Xoconostle-Cázares y Roberto Ruiz Medrano. Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: el caso de las micorrizas. Avance y Perspectiva **21**: (2002) 263-266.

- Byung-Chun Yoo, Koh Aoki, Yu Xiang, Leslie R. Campbell, Richard J. Hull, **Beatriz Xoconostle Cázares, B**., Jan Monzer, Jung-Youn Lee, Diane, E. Ullman and William Lucas. (2000). Characterization of *Cucurbita maxima* phloem Serpin- 1 (CmPS-1). J Biol Chem. **275:** (2000) 35122-35128.

- C. Hagen, M. R. Rojas, M. R. Sudarshana, **B. Xoconostle-Cazares,** E.T. Natwick, T. A. Turini, R. L. Gilbertson. Biology and molecular characterization of *Cucurbit leaf crumple virus*, an emergent cucurbit-infecting begomovirus in the Imperial Valley of California. (2008) Plant Disease. 92 (5): 781-793.

- Chávez-Bárcenas A.T., Valdéz-Alarcón J.J., Martínez Trujillo, M., Chen, L., **Xoconostle-Cázares, B.,** Lucas, W.J. Herrera-Estrella, L. (2000). Tissue specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* gene. Plant Physiology. Plant Physiol. (2000) 124:641-54.

- Chen LF, Rojas M, Kon T, Gamby K, Xoconostle-Cazares B, Gilbertson RL. (2009) A severe symptom phenotype in tomato in Mali is caused by a reassortant between a novel recombinant begomovirus (Tomato yellow leaf curl Mali virus) and a betasatellite. Mol Plant Pathol. 2009 May;10(3):415-30. PMID:19400843.

- De la Riva, G.; **Xoconostle-Cázares,** B.; Gutierrez, C.; Morán, R., Alvarez, A.; Herrera-Estrella, L. and Perez, Expresión heteróloga del gen que codifica para la delta-endotoxina activa de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* en *E. coli*. Biotecnología Aplicada. **9**: (1992) 31-37.

- Descripción original de la especie Zea diploperennis. Science, Volume 203 M.C. Molina

- Descripción original de la especie Zea perennis. American Journal of Botany, Volume 29,

- Descripción original de la subespecie Zea mays subsp. mexicana. Phytologia, Volumen 23(2).

- Flores-Gómez E, Ruiz-Medrano R, Morales-Rayas R, Herrera-Martínez A, Reyes-Márquez, **Xoconostle-Cázares B.** Interkingdom Macromolecular Trafficking in Endomycorrhiza Evidenced by GFP Translocation, Biology of Plant-Microbe Interactions volume 5, (2006) 531-535

- Flores-Gómez E., Gómez-Silva L., Ruiz-Medrano R., **Xoconostle-Cázares B** (2009) Acetosyringone promotes transcription of fungal genes in the AM *Glomus intraradices.* Aceptado en International Microbiology.

- Gottschalk M, Dolgener E, **Xoconostle-Cázares B**, Lucas WJ, Komor E, Schobert C. (2008) Ricinus communis cyclophilin: functional characterisation of a sieve tube protein involved in protein folding. Planta 228 (4):687-700. PMID: 18594858

- Gottschalk M, Dolgener E, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ, Komor E, Schobert C. (2008) Ricinus communis cyclophilin: functional characterisation of a sieve tube protein involved in protein folding. Planta. 2008 Sep;228(4):687-700. PMID:18594858.

- Ham BK, Brandom JL, **Xoconostle-Cázares B,** Ringgold V, Lough TJ, Lucas WJ (2009). A Polypyrimidine Tract Binding Protein, Pumpkin RBP50, Forms the Basis of a Phloem-Mobile Ribonucleoprotein Complex. Plant Cell. PMID: 19122103

- Ham BK, Brandom JL, **Xoconostle-Cázares B**, Ringgold V, Lough TJ, Lucas WJ. (2009) A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. Plant Cell. 2009 Jan;21(1):197-215. PMID:19122103

- Herrera-Martínez A., Ruiz-Medrano R., Valdés M., **Xoconostle-Cázares B.** (2009) Detection of a histidine kinase mRNA in extraradical mycelium of *Pisolithus tinctorius* induced by the plant. Aceptado Journal of Biological Sciences.

- Higashiyama T. Novel functions and applications of trehalose. Pure Appl. Chem. 2002;74:1263–1269.

- Hinojosa-Moya J, **Xoconostle-Cázares B**, Piedra-Ibarra E, Méndez-Tenorio A, Lucas WJ, Ruiz-Medrano R. (2008) Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. J Mol Evol. 2008 May;66(5):472-83. PMID:18392759

- Hinojosa-Moya J, **Xoconostle-Cázares B,** William J. Lucas and Ruiz-Medrano R, Differential Accumulation of a Translationally Controlled Tumor Protein mRNA from *Cucurbita maxima* (pumpkin) in Response to CMV Infection, Biology of Plant-Microbe Interactions volume 5, (2006) 242-246

- Hinojosa-Moya J.J., Piedra-Ibarra E., **Xoconostle-Cazares, B,** Lucas W.J., Ruiz-Medrano R. (2008). Phylogenetic and Structural analysis of translationally controlled tumor proteins Journal of molecular evolution. 66 (5): 472-483.

- Holland N., Holland, D., Helentjaris, T., Kanwarpal, D., **Xoconostle-Cázares, B**. & Delmer P. D. A comparative analysis of the *CesA* gene family of plants. Plant Physiol**. 123**(2000):1313-24.

- Ibarra, J., Jofre, A., **Xoconostle, B.** Herrera, L. Transgenic Plants with novel *Bacillus thuringiensis* toxin genes for insect pest control in Latin America. Biotech. Biol. Pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management. Cornell University, (1990) 49-53.

- José Ruiz-Herrera, **Xoconostle-Cázares B,** Cristina G. Reynaga-Peña, Claudia León Ramírez & Alfonso Cárabez-Trejo. Immunolocalization of the chitin synthases in the phytopathogenic dimorphic fungus *Ustilago maydis.* FEMS Yeast Res. **6:** (2006) 999-1009

- Kragler, F. Monzer, J., Shash K., **Xoconostle-Cázares, B**., Lucas, W. J. Cell-to-cell transport of Proteins: requirements for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. Plant Journal. **15:** (1998) 367-381.

- Kragler, F., Monzer J., **Xoconostle-Cázares, B**., Lucas W. J. (2000). Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. EMBO J. 19: 2856-2868. 2000.

- León Ramírez E **Xoconostle Cázares B**, Ruiz Medrano R. Comunicación intercelular a larga distancia via el floema en plantas (2003) Ciencia al día (revista electrónica)

- Lin MK, Belanger H, Lee YJ, Varkonyi-Gasic E, Taoka KI, Miura E, **Xoconostle-Cazares B**, Gendler K, Jorgensen RA, Phinney B, Lough TJ, Lucas WJ. FLOWERING LOCUS T Protein May Act as the Long-Distance Florigenic Signal in the Cucurbits. Plant Cell. (2007) 19(5): 1488-1506. PMID: 17540715.

- Lough, T. J.; Shash, K.; **Xoconostle-Cázares, B**.; Hofstra, K. R.; Beck, D. L.; Balmori, E.; Forster, R. L. S.; Lucas, W. J. Molecular dissection of the mechanism by which potevirux triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. Molecular Plant Microbe Interaction. **11**(8): (1998) 801-814. (Es portada de la revista)

- M. Molina (1986). Estudio citogenético de Zea perennis. Genética Ibérica, Volumen 38.

- M.C. Molina (1985). Cytogenetic study of a tetraploid hybrid Zea diploperennis x Zea perennis. Cytologia, Volumen 50.

- Montalvo-Hernández L, Piedra-Ibarra E, Gómez-Silva L, Lira-Carmona R, Acosta-Gallegos JA, Vazquez-Medrano J, **Xoconostle-Cázares B**, Ruíz-Medrano R. (2008) Differential accumulation of mRNAs in drought-tolerant and susceptible common bean cultivars in response to water deficit. New Phytol. 2008;177(1):102-13. PMID:17961132

- Montalvo-Hernández L., Piedra-Ibarra E., Gómez-Silva L., Lira-Carmona R, Acosta-Gallegos JA., Vazquez-Medrano J, **Xoconostle-Cázares B**, Ruíz-Medrano R (2008). Differential

accumulation of mRNAs in drought-tolerant and susceptible common bean cultivars in response to water deficit. New Phytologist 177:102-13. PMID: 17961132

- Montero-Tavera V, Ruiz-Medrano R, **Xoconostle-Cázares B**. Systemic nature of drought-tolerance in common bean (2008) Plant Signal Behav. 2008 Sep;3(9):663-6. PMID:19704819

- Montero-Tavera V., Acosta-Gallegos JA., Ruiz-Medrano R., **Xoconostle-Cázares B.** (2008). Molecular analysis of mRNAs associated to early stages of flowering and effect of natural selection over their expression in a photoperiod-neutral common bean variety. Plant Signaling and Behavior 3 (9): 663-666.

- Montero-Tavera V., Ruiz-Medrano R., **Xoconostle-Cázares B.** (2008). Systemic nature of drought-tolerance in common bean Plant Signaling and Behavior 3 (9): 663-666.

- Montes-Horcasitas M.C., Ruiz-Medrano R., Magaña-Plaza I. **Xoconostle-Cázares B.** Efficient transformation of *Cellulomonas flavigena* by electroporation and conjugation with *Bacillus thuringiensis*. Curr. Microbiol. 49: (2003) 428-432.

- Morales-Rayas R, Ruiz-Medrano R, **Xoconostle-Cázares B**. (2011) Macromolecular trafficking between a vesicular arbuscular endomycorrhizal fungus and roots of transgenic tobacco. Plant Signal Behav. 2011 May 1;6(5). PMID:21448001.

- Ortega-Larrocea Mdel P, **Xoconostle-Cázares B**, Maldonado-Mendoza IE, Carrillo-González R, Hernández-Hernández J, Garduño MD, López-Meyer M, Gómez-Flores L, González-Chávez Mdel C (2010) Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapan, Hidalgo, Mexico. Environ Pollut. 2010 May;158(5):1922-31.

- Paiva CLA, Panek AD. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. Biotechnol. Annu. Rev. 1996;2:293–314.

- Peña-Castro JM, Barrera-Figueroa BE, Fernandez-Linares L, Ruiz Medrano R, y **Xoconostle Cázares B.** (2006) Isolation and identification of up-regulated genes in bermidagrass roots (*Cynodon dactylon L.)* grown under petroleum hydrocarbon stress. Plant Science 170: 37-53.

- Peña-Castro JM, Barrera-Figueroa BE, Roberto Ruiz Medrano R, y **Xoconostle Cázares B.** Las bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo, Terra Latinoamericana 24:(2006) 529-540.

- Pérez-Moreno J., Martínez-Reyes M., Yescas-Pérez A., Delgado-Alvarado A., **Xoconostle-Cázares B.** (2008) Wild Mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. Economic Botany 62(3): 425-436.

- Piedra-Ibarra E, De La Torre-Almaráz R, Zúñiga G, **Xoconostle-Cázares B**, Ruíz-Medrano R. (2005). *Leonotis nepetaefolia:* an important plant virus reservoir in Central Mexico. Phytoparasitica 33:480-494.

- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, van Dun K, Voogd E, Verwoerd TC, Krutwagen RWHH, Goddijn OJM. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. J. Plant Physiol. 1998; 152:525–532.

- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schimdt H, Wolterbeek APM, Wallakenns-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: A review of properties, history of use and humans tolerance, and results of multiple safety studies. Food Chem. Toxicol. 2002;40:871–898.

- Rodríguez-Tovar AV, Ruiz-Medrano R, Herrera-Martinez A, Barrera-Figueroa BE, Hidalgo-Lara ME, Reyes-Marquez BE, Cabrera-Ponce JL, Valdes M, **Xoconostle-Cazares B** (2005)

Stable genetic transfromation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Journal of Microbiological Methods. 63:45-54.

- Rojas M.R., Hao Jiang, Salati, R., **Xoconostle-Cázares, B**., Sudarshana M. R., Lucas, W.J., Gilbertson R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. Virology **191:**(2001)110-125. (Es portada de la revista).

- Rosano-Hernandez MC, Fernandez-Linares LC, **Xoconostle-Cazares B** (2009) Bacterial Diversity of marine seeps in the southeastern gulf of mexico. Aceptado P. Journal of Biological Sciences.

- Ruiz-Herrera, J. and **Xoconostle-Cázares, B**. Molecular and genetic control of chitin biosynthesis in fungi. Archives of Medical Research **26:** (1995) 315-321.

- Ruiz-Herrera, J. and **Xoconostle-Cázares, B**. Molecular and genetic control of chitin biosynthesis in fungi. Archives of Medical Research **26:** (1995) 315-321.

- Ruiz-Herrera, J., Martínez-Espinoza, A. D., Alvarez, P. E., **Xoconostle-Cázares, B.** Carboxin-Resistant Mutant of *Ustilago maydis* is impaired in its , pathogenicity for *Zea mays*. Current Microbiology **39:** (1999) 291-294.

- Ruiz-Medrano R, Hinojosa-Moya J, **Xoconostle-Cazares B**, Lucas W.J. (2007) Influence of cucumber mosaic virus infection on the mRNA population present in the phloem translocation stream of pumpkin plants. Functional Plant Biology 34:

- Ruiz-Medrano R, Hinojosa Moya, **Xoconostle-Cázares B** and Lucas W. J. Influence of cucumber mosaic virus infection on the mRNA population present in the phloem translocation stream of pumpkin plants. Functional Plant Biology Volume 34 Number 4 (2007) pp. 292-301.

- Ruiz-Medrano R, **Xoconostle-Cázares B**, Ham BK, Li G, Lucas WJ. (2011) Vascular expression in Arabidopsis is predicted by the frequency of CT/GA-rich repeats in gene promoters. Plant J. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04581.x PMID:21435051.

- Ruiz-Medrano R, **Xoconostle-Cázares B**, Kragler F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. Curr. Op. in Plant Biology 7: (2004) 641-650.

- Ruiz-Medrano R, **Xoconostle-Cázares B,** Lucas WJ. The phloem as a conduit for inter-organ communication. Curr Opin Plant Biol. **4:**(2001) 202-209.

- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Lucas W.J. Funciones del floema. Investigación y Ciencia **278:** (1999) 46-47.

- Ruiz-Medrano, R.; **Xoconostle-Cázares, B**.; Lucas, W.J. Phloem Long-distance transport of *CmNACP-1* mRNA: Implications for Supracellular Regulation in Plants. Development. **126:** (1999) 4505-4519. (Es portada de la revista)

- Santiago-Hernández, Vásquez-Bahena, Calixto-Romo, **Xoconostle-Cázares**, Ortega-López, Ruiz-Medrano, Montes-Horcasitas, Hidalgo-Lara, (2005) Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding domain CBD_{cex} from *Cellulomonas fimi.* Technology Journal. 40: (2005) 172-176.

- Taoka KI, Ham BK, **Xoconostle-Cazares B**, Rojas MR, Lucas WJ. Reciprocal Phosphorylation and Glycosylation Recognition Motifs Control NCAPP1 Interaction with Pumpkin Phloem Proteins and Their Cell-to-Cell Movement. Plant Cell. (2007) 19(6):1866-84.PMID: 17601822.
- Torres-Guzmán, J. C.; **Xoconostle-Cázares, B.;** Ortiz, L.; Guevara-Olvera, L.; San-Blas, G.; Dominguez, A.; Ruiz-Herrera, J. Comparison of fungal ornithine decarboxylases. Current Microbiology. **33**: (1997) 390-392.
- Xoconostle-Cázares B. y Ruiz-Medrano R. Comunicación intercelular en plantas basada en macromoléculas. Biotecnología **5:** (2000) 74-79.
- Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R (2005). Transporte de señales a través del floema en plantas. Biojournal. Revista virtual española (ISSN 1699-1591; http://www.biojournal.net) No. 3, Agosto 2005.
- Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., Lucas, W.J. (2000) Proteolytic processing of CmPP35, a protein from the cytochrome B_5 reductase family, is requerid for entry into the phloem translocation pathway. Plant J. (2000) 24(6):735-747.
- Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang H-L., Monzer, J., Yoo- B-C. , McFarland K.C., Franceschi V. R., Lucas W. J. Plant paralog to viral movement protein potentiates transport of mRNA into the phloem. Science **283**: (1999) 94-98. (Es portada de la revista)
- Xoconostle-Cázares, B.; León-Ramirez, C. and Ruiz-Herrera, J. Two chitin synthase genes from *Ustilago maydis*. Microbiology (Reading) **142**: (1996) 337-387.
- Xoconostle-Cázares, B.; Specht, C A.; Liu. J.; León-Ramirez, C; Robbins, P.W. Ruiz-Herrera, J. *UmCHS5*, a gene coding for a class IV chitin synthase in *Ustilago maydis*. Fungal Gen. Biol. **22**(3): (1997) 199-208.
- Zimmerman, J. W.; Specht, C.A.; **Xoconostle-Cázares, B.**; Robbins P.W. The isolation of a Dol-P-Man synthase from *Ustilago maydis* that functions in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **12**: (1997) 765-771.
(1985). Cytogenetic study of a tetraploid hybrid Zea diploperennis x Zea perennis. Cytologia,50:1.

http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/cicy_yucatan.html
-Agentes Bioactivos de Plantas Desérticas de Latinoamérica (ICBG)
-Árboles y Arbustos Nativos para la Restauración Ecológica y Reforestación de México (IE-DF, UNAM) http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-df-unam.html
-Avonce N, Leyman B, Mascorro Gallardo JO, van Dijck P, Thevelein J, Iturriaga G. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. Plant Physiol. 2004;136:3649–3659.
-Avonce N, Leyman B, Thevelein J, Iturriaga G. Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. Biochem. Soc. Trans. 2005;33:276–279.
-Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH)
Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cflxyn11A) from Cellulomonas flavigena. Bioresour Technol. 2010 Jul;101(14):5539-45. Epub 2010 Mar 15. PMID:20231092[PubMed - indexed for MEDLINE]
-Colección de ejemplares tipo del Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX)
-Colección de Monocotiledóneas Mexicanas (UAM-I)

-Colecciones de George Boole Hinton depositadas en el herbario de Kew: Familia Leguminosae http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/rbgk.html
-Cortina C, Culiáñez-Macià FA. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. Plant Sci. 2005;169:75–82.
Detection of a histidine kinase mRNA in extraradical mycelium of Pisolithus tinctorius induced by the plant metabolites. Pak J Biol Sci. 2009 Jan 15;12(2):189-91.
-Ejemplares tipo de plantas vasculares del Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
-Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. Glycobiology. 2003;13:17R–27R.
-Eroglu A, Russo MJ, Biegansky R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, Toner M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. Nat. Biotechnol. 2000; 18:163–167.
-Estudio Florístico de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, México (ENCB, IPN)
-Estudio monográfico del género Echinopepon Naud. (Cucurbitaceae) en México (ENCB, IPN)
-Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México (FES-I, UNAM)
Fuentes de consulta electrónica:
-Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala A, Choi Y, Kochian L, Wu RJ. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;99:15898–15903.
-Guo N, Puhlev I, Brown DR, Mansbridge J, Levine F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. Nat. Biotech. 2000;18:168–171.
-Herbario de Geo. B. Hinton, México http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/hinton.html
-Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
-Herbario de la Universidad de Arizona, EUA (ARIZ)
-Herbario de la Universidad de Texas - Austin, EUA (LL, TEX)
-Herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, México (CICY)
-Herbario del CIBNOR http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_cibnor.html
-Herbario del Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBIO)
-Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-BAJíO)
-Herbario Kew del Real Jardín Botánico (RBGKEW)
-Herbario Sessé y Mociño: Plantas de la Real Expedición Botánica a Nueva España (1787 - 1803) (MA) http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/sesse.html
-Herbario Weberbauer de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL)
-Herbario XAL del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-XAL)
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/bangev-uach.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/coleccion_ejemplares_herbario%20_tx.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ejemplares_tipo_plantas_vasculares.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/encb-ipn.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_floristico_ipn.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_monografico_ipn.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_utildos_comunidades.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_valle_tehuacan_cuicatlan.html

http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_universidad_arizona.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ibunam_ibcg.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-bajio.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-xal.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/inbio.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/jbny.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/kew.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/lamolina.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ll-tex.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/missouri.html
http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/uam-i.html
-Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Sweet relief for Huntington disease. Nat. Med. 2004; 10:123–124.
-La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de Las Salinas, Puebla, México (FES-I, UNAM)
-Leyman B, Avonce N, Ramon M, van Dijck P, Iturriaga G, Thevelein JM. Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. J. Biotechnol. 2006;121:309–317.
-Lunn JE. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. Funct. Plant Biol. 2007;34:550–563.
Mangelsdorf. Agro-Ciencia, Volumen 58.
Number 10. M. del C. Molina, M.D. García (1999). Influence of ploidy levels on phenotypic and cytogenetic traits in maize and Zea perennis hybrids. Cytologia, Volumen 64.
-Programa de repatriación de datos de ejemplares mexicanos
Rentería-Canett I, Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Medrano R, Rivera-Bustamante RF. (2011) Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. Virol J. 8;8:104. PMID:21385390
-w3TROPICOS, Jardín Botánico de Missouri (MO)
-Y.T. Kato (1984). Mecanismos de diploidización en Zea perennis (Hitchcock) Reeves and Zea mays parviglumis

Tasa de entrecruzamiento entre miembros del género Zea

La tasa de entrecruzamiento entre miembros del género Zea depende de (1) la compatibilidad genética, (2) distancia de aislamiento, (3) aislamiento por fechas de siembra, (4) biología de la inflorescencias masculina y femenina y (5) las condiciones ambientales presentes al momento de la polinización (por ejemplo: temperatura, humedad relativa, potencial atmosférico del agua). El maíz cultivado se puede entrecruzar con variedades de polinización abierta y razas locales (Castillo y Goodman, 1997; Cervantes, 1998). El maíz cultivado puede entrecruzarse con el teocintle siempre y cuando se cumplan ciertas condiciones. La primera condición es la compatibilidad genética entre el maíz cultivado y el teocintle (*Zea* spp.) (Castro Gil, 1970; Kermicle, 2001; Baltazar et al., 2005). Castro Gill (1970) polinizó numerosas razas de México y Centro América con una mezcla de teocintle de Chalco y Guerrero. El reportó que la mitad de las mazorcas no produjeron grano y concluyó que la competencia del polen fue probablemente la causa principal de la falta de producción de semillas híbridas (maíz – teocintle) en las mazorcas polinizadas. Resultados similares fueron reportados por Baltazar et al., (2005) donde se obtuvieron diferentes números de semilla en mazorcas de razas locales y maíces híbridos, polinizadas con polen de teocintle (ssp. *mexicana).* Kermicle (1997) y Lino de la Cruz (2007) reportaron que la incompatibilidad del sistema *Ga1-s* está presente en razas locales de maíz y teocintles, por lo tanto, es posible que la falta de polinización en los estudios realizados por Castro (1996) y Baltazar et al. (2005) se debieran a la presencia de *Gal-s.* Experimentos de entrecruzamiento entre maíz y teocintle ssp. *mexicana* han evidenciado la dificultad de que el polen de maíz polinice las estigmas del teocintle (Kato, 1997; Evans y Kermicle 2001; Baltazar et al., 2005). Evans y Kermicle (2001) demostraron que cuando se aplica polen de teocintle a estigmas de maíz, se producen híbridos entre las dos sub-especies. Sin embargo, cuando estigmas de teocintle son polinizados con polen de maíz, las plantas de teocintle ssp. *mexicana* (razas de Chalco y Meseta Central) se producen de manera muy inconsistente o no producen semilla. Estos investigadores determinaron que la incompatibilidad entre el teocintle y el maíz se encuentra bajo el control del gen barrera del cruzamiento del teocintle (*Teosinte crossing barrier 1, Tcb*1), localizado en el brazo corto del cromosoma

4. Debido a la ausencia de polinización recíproca. Evans y Kermicle (2001) sugirieron que *Tcb1* podría jugar un papel significativo en el aislamiento reproductivo del teocintle de maíz en áreas de México y Guatemala donde el teocintle y el maíz crecen de manera simpátrica.

Baltazar et al. (2005) reportaron resultados similares en México. En este estudio, varias características de plantas de teocintle fueron reportadas que podían disminuir la polinización de la planta del teocintle por otros taxa. El teocintle produce un gran volumen de polen y tiene un reducido número de estigmas en relación al maíz. El teocintle típicamente libera el pólen con un gran número de espigas que emergen asincrónicamente durante un periodo de aproximadamente 15 días, comparado con los 5 días de liberación para un híbrido comercial de cruza simple. El teocintle frecuentemente produce ramificaciones laterales con estigmas próximos a las espigas terminales. Estos factores incrementan substancialmente la probabilidad de que el polen del teocintle fertilice los estigmas del teocintle y reducen la probabilidad de que el teocintle sea polinizado por el maíz. En contraste, Ellstrand et al. (2007) reportaron un entrecruzamiento del 50% entre el maíz y el teocintle ssp. *parviglumis*, sugiriendo que las barreras presente en el teocintle ssp. *mexicana* no están presentes en el teocintle ssp. *parviglumis*.

El aislamiento espacial y temporal es otra condición para mantener al maíz y al teocintle como entidades separadas. De acuerdo con Wilkes (1967) la temporada de crecimiento típica del teocintle en México es de junio a noviembre. Las semillas germinan con el inicio de las lluvias de verano y crecen de forma paralela, pero más tarde que los maíces locales cultivados. La floración ocurre en septiembre - octubre y las semillas maduran en noviembre. Como resultado, el teocintle y el maíz se pueden considerar aislados temporalmente en la mayoría de los sitios en donde aparecen juntos; sin embargo, pueden coexistir.

Debido a la evidencia experimental presentada, nuestro grupo de investigación propone la posibilidad de la coexistencia de especies en áreas endémicas de teocintle, pues no existe la posibilidad de introgresión en teocintle.

III. Identificación de los posibles riesgos que la liberación de los OGMs pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica.

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

Como se cita en el apartado III c, se realizó una caracterización exhaustiva de los materiales genéticamente mejorados, además de haber sido comparados con materiales silvestres. En esta caracterización no se identificó ninguna característica que pueda tener efectos adversos sobre la diversidad biológica y el ambiente.

Para llegar a esta conclusión, se consideraron los siguientes elementos que se describen abajo:

El maíz es un cultivo anual que depende de la intervención humana para sobrevivir (Martínez-Soriano y Leal-Klevezas, 2000). Por lo tanto, las plantas de maíz no sobrevivirán naturalmente como maleza. En contraste, las plantas de teocintle tienen características de maleza (por ejemplo, latencia de la semilla, dispersión de semilla) que han ayudado al teocintle a sobrevivir de forma silvestre por miles de años (Mondrus-Engle, 1981). El fenotipo de los OGMs es vigoroso y no muestran características que puedan heredarse en detrimento de su desarrollo fenológico.

IIIe. Comparación de la expresión fenotípica del OGM respecto al organismo receptor, que incluya ciclo biológico y cambios en la morfología básica.

Por favor, note que en el apartado IIIc se detalla la comparación de la expresión fenotípica en el ciclo de vida y se compara con la variedad silvestre, al igual que a dos variedades criollas tolerantes a sequía. Las características morfológicas básicas no cambiaron, sin embargo, a nivel fisiológico se observa una mayor tasa fotosintética en las plantas CIE-9. A nivel bioquímico las plantas acumulan más trehalosa, aunque dentro del rango reportado para maíces amarillos o dulces.

Abajo se describen algunas diferencias entre el maíz y el teocintle, que complementan la pregunta de esta apartado IIIe.

Morfológicamente el maíz y el teocintle son similares, con flores estaminadas desarrollándose en las espigas y las flores pistiladas desarrollándose en los jilotes axilares. La mazorca del maíz es sólida, mientras que la mazorca del teocintle es quebradiza y se separa de la planta al llegar a la madurez para promover la dispersión de las semillas (Eubanks, 2001). Las semillas del teocintle están protegidas por estructuras con alto contenido de celulosa y lignina llamadas fructificaciones. Las fructificaciones están compuestas de segmentos sólidos del raquis de la espiga, así como glumas lignificadas externas que promueven la latencia (Mondrus-Engle, 1981). La dispersión y latencia de la semilla, así como el desarrollo de barreras de incompatibilidad genética en el teocintle ssp. *mexicana* son características que han ayudado a que el maíz y el teosinte ssp. *mexicana* hayan coexistido como entidades diferentes por miles de años (Baltazar et al., 2005).

Prácticas agronómicas comúnmente utilizadas comparadas con su contraparte convencional.

Esta variedad CIE-9 debe usarse con las mismas prácticas agronómicas que en la agricultura de subsistencia y comercial. De acuerdo a las características del fenotipo del OGM, no presentan diferencias en cuanto a las prácticas agronómicas comúnmente utilizadas comparadas con su contraparte convencional; tal y como se evaluó bajo condiciones controladas de invernadero. El motivo de la presente solicitud es evaluar en suelo el desempeño de estas líneas genéticamente mejoradas. Los resultados nos permitirán identificar si se pueden establecer diferencias en las prácticas agronómicas referentes a modificar el suministro de agua. Estas diferencias pueden estar en el riego que necesiten los cultivos. En este ensayo experimental se pretende cuantificarr la disminución de riego para poder proponer diferencias en las prácticas agronómicas de este cultivo.

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

La tolerancia a sequía es una característica altamente deseable en agricultura. A pesar de este hecho, el ensayo experimental se realizará con las medidas de bioseguridad que

eviten la eventual introgresión de esta característica en plantas sexualmente compatibles. La evaluación de maíz tolerante a sequía será un evento experimental contenido.

Se ha propuesto el establecimiento de dos barreras, física y temporal: La física está constituida por plantas de maíz comercial de la región, esta barrera contendrá el posible flujo de polen hacia el exterior de la parcela.

La segunda barrera es de tipo temporal. Esta consiste en la siembra desfasada de la línea pura de maíz genéticamente modificado. La siembra se retrasará un mes con respecto a las posibles siembras que ocurran en el campo agrícola. Así, la presencia de polen modificado ocurrirá ya se hayan fertilizado las mazorcas de maíz que posiblemente se siembren en esa área.

Es muy importante considerar que en la región no existen siembras de maíz y no se cuenta con teocintle en el Estado de Sinaloa.

Las plantas con las que se experimentará no tienen ventajas sobre los maíces convencionales. Nuestro interés es el de evaluar la respuesta a tolerancia a sequía. Por otra parte, la siembra de maíz en la región se realiza con híbridos comerciales a partir de semilla certificada. Considerando que la diversidad biológica del maíz de la región se reduce a los híbridos comerciales, y que éstos solo pueden crecerse a partir de semilla certificada; no podrá haber introgresión del carácter y las semillas no podrán ser utilizadas para su propagación, como lo establece el vendedor de la semilla mejorada. Con esta explicación, declaramos que no existirán efectos sobre la diversidad biológica de los maíces comerciales híbridos desarrollados por semilleras transnacionales.

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

Dinámica de polinización en el género Zea

El teocintle y el maíz son especies de polinización anemófila, por lo tanto, los niveles de entrecruzamiento están estrechamente relacionados a la biología de las inflorescencias femenina y masculina. Una espiga individual de maíz hibrido de tamaño normal puede producir hasta 25 millones de granos de polen (Kiesselbach, 1999). El teocintle tiene un

mayor número de espigas y un número menor de granos de polen en comparación al maíz, por lo tanto en base a planta, es un mayor productor de polen que el maíz (Baltazar et al., 2005; Aylor et al., 2005). La dispersión del polen del maíz está determinada por una diversidad de factores ambientales y físicos. La dirección, turbulencia y velocidad del viento están directamente relacionadas con el movimiento del polen (James y Brooks, 1950; Di-Giovanni y Kevan, 1991; Di-Giovanni et al., 1995). Otros factores como la densidad del polen, densidad y viscosidad del aire, velocidad de sedimentación y radio del polen, parecen influenciar su transporte y su deposición (Di-Giovanni et al., 1995). Una vez en la atmósfera, los granos de polen se deben mantener viables el tiempo suficiente para llevar a cabo el proceso de polinización (Luna et al., 2001). Los estigmas emergen típicamente del jilote de uno a tres días después de que inicia la liberación de polen. Una mazorca de maíz híbrido puede producir hasta un promedio de 1000 estigmas (Kiesselbach, 1999). En la ausencia de fertilización y bajo condiciones normales de riego, la elongación de los estigmas del maíz continúa por aproximadamente 7 a 10 días antes de que comiencen a fenecer (Basseti y Destrate, 1993a; Basseti y Destrate, 1993b). Patrones similares de elongación de los estigmas han sido observados en experimentos realizados en México con razas locales, híbridos de regiones templadas y teocintles (Baltazar y Schoper, 2001). Sin embargo, los estigmas de las razas locales manifestan una tendencia a detener la elongación después de 10 días y los estigmas de los teocintles a los 3-4 días después de emergidos del jilote. Los estigmas proveen al grano de polen de humedad y otros nutrientes, lo que provoca su geminación. El crecimiento del tubo polínico es visible por lo regular a los 30 minutos de que el grano de polen haya llegado a un estigma receptivo y la fertilización suele ocurrir dentro de aproximadamente 24 horas (Kiesselbach, 1999).

Híbridos resultados de la cruza entre organismos convencionales y sus parientes silvestres

Los híbridos entre el teocintle y el maíz están presentes bajo condiciones naturales en la Meseta Central y el Valle de México (Wilkes, 1967; Wilkes, 1977). La semilla híbrida es fértil pero se espera algún porcentaje de semilla con dormancia ya que es un rasgo relacionado con el teocintle (Mondrus-Eagle, 1981; Baltazar et al., 2007). Existe información limitada con respecto a la viabilidad y capacidad de reemplazo de los

híbridos de maíz x teocintle entre el maíz cultivado y el teocintle ssp. mexicana. Esto puede deberse a la dificultad de producir híbridos en cruzas recíprocas (Evans y Kermicle, 2001; Baltazar et al., 2005).

Referente a la sanidad vegetal: El maíz tolerante a sequía no puede ser considerado una plaga o maleza persistente, ya que tiene las mismas características de ciclo de vida que un maíz sin mejorar. Asimismo, carece de ventajas adaptativas que le permitan vivir en hábitats naturales o bien ocupar nichos ecológicos de organismos relacionados. El maíz CIEA-9 necesita dos aplicaciones de fertilizante y no es resistente a herbicidas.

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

-Aguirre-Gomez, J.A., Bellon, M.R. y Smale, M. 2000. A regional analysis of maize biological diversity in Southeastern Guanajuato, Mexico. Economic Botany. 54(1):60-72.

-Aylor E.D., B.M. Baltazar y J.B. Schoper. 2005. Some physical properties of teosinte (Zea mays subsp. parviglumis) pollen. J Exp Bot 56(419): 2401-2407.

-Baltazar M.B, J.B. Schoper. 2001. Maize pollen biology, pollen drift and transgenes. In: Proc 56th Cornand Sorghum Seed Res Conf. Chicago.

-Baltazar M.B., D.J. William, D.L. Kendrick, y J.M. Horak. 2007. Assessment of potential impact of hybridization between teosinte (Zea spp.) and maize (Zea mays spp. mays) on dormancy characteristics of teosinte. Gene flow symposium at the North Center.

-Baltazar M.B., J.J. Sánchez-Gonzalez, L. De la Cruz-Larios and J.B. Schoper. 2005. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico. Theor Appl Genet. 110:519-526.

-Bassetti P. and M.E. Westgate. 1993a. Emergence, elongation, and senescence of maize silks. Crop Sci. 33:271-275.

-Bassetti P. and M.E. Westgate. 1993b. Senescence and receptivity of maize silks. Crop Sci. 33:275-278.

-Benz, B.F. 2001. Archaeological evidence of teosinte domestication from Guila Naquitz, Oaxaca. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2104-2106.

-Bellon M.R., y S.B. Brush. 1994. Keepers of maize in Chiapas, Mexico. Econ. Bot. 48:196–209.

-Castillo G.F. y M.M. Goodman. 1997. Research on gene flow between improved land races. In: Serratos J.A., Willcox M.C., Castillo-Gonzalez F. (eds) Proc Forum: gene flow among maize landraces, improved maize varieties, and teosinte: implications for transgenic maize''. CIMMYT, El Batan, Mexico, pp 67–72

-Castro-Gil M. 1970. Frequencies of maize by teosinte crosses in a simulation of a natural association. Maize gen. Coop. Newsletter 44:21-24.

-Cervantes M.J.E. 1998. Infiltración genética entre variedades locales e introducidas de maíz de sistema tradicional de Cuzalapa, Jalisco. PhD thesis, Colegio de Postgraduados, Montecillo-Texcoco, Edo. De México, México CIMMYT http://www.cimmyt.org/

-De la Cruz L. 2007. Sistemas de incompatibilidad genética en maíz y teosinte (Zea spp.) in México.Tesis Doctoral. Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco. Enero 30, 2007.

-Deng, M.Y., Lirette, R.P., Cavato, T.A. and Sidhu, R.S. (1999). Molecular Characterization of Roundup Ready Corn Line NK603. Technical Report MSL-16214, Monsanto Company, St. Louis, MO.

-Di-Giovanni F. y P.G. Kevan. 1991. Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. Can. J. For. Res. 21:1155–1170.

-Di-Giovanni F., P.G. Kevan, y M.E. Nasr. 1995. The variability in settling velocities of some pollen and spores. Grana 34:39–44.

-Doebley, J. F. 1990. Molecular evidence and the evolution of maize. Econ. Bot. 44 (3 supplement): 6- 27.

-Doebley J.F. and H.H. Iltis. 1980. Taxonomy of Zea (Gramineae). II. A subgeneric classification with key to taxa. Amer. J. Botany 67:982-993

-Ellstrand N.C., L.C. Garner, S. Hegde, R. Guadagnuolo y L. Blancas. 2007. Spontaneous hybridization between maize and teosinte. J. of Hered. 98(2):183-187.

-Eubanks M.W. 2001. The mysterious origin of maize. Econ. Bot. 55:492–514.

-Evans M.M.S. y J.L. Kermicle. 2001. Teosinte crossing barrier1, a locus governing hybridization of teosinte with maize. Theor. Appl. Genet. 103:259–265.

-FAO http://www.fao.org/index_es.htm

-Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand,

- Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S-B., Hoffmann, N-L., Woo, S.C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc Nat Acad Sci U.S.A., 80(15), 4803-07.

-Fuente AgBios http://www.agbios.com/

-Gould, F.W. (1968). Grass Systematics. McGraw Hill, N.Y., USA.

-Guadagnuolo R., J. Clegg, y N.M. Ellstrand. 2006. Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. Ecol. Appl. 16(5):1967-1974.

-Jones, J.M., y J.S. Brooks. 1950. Effectiveness and distance of border rows in preventing outcrossing in corn. Oklahoma Agric. Exp. pollen Sta. Tech. Bull. No. T-38.

-Jugenheimer, R.W. (1976). Maize Improvement, Seed Production, and Uses, John Wiley & Sons, Inc. New York, New York.

-Kato Y.T.A. 1997. Review of introgression between maize and teosinte. In: Serratos JA, Willcox MC,

-Castillo F (eds) ProcForum: gene flow among maize landraces, improved maize varieties, and teosinte: implications for transgenic maize. CIMMYT, Mexico City, pp 44–53

-Kermicle J. 1997. Cross compatibility within the genus Zea. In: Serratos JA, Willcox MC, Castillo F (eds) Proc Forum: Gene flow among maize landraces, improved maize varieties, and teosinte: implications for transgenic maize. CIMMYT, Mexico City, pp 43

-Kiesselbach, T.A. (1980). The structure and reproduction of corn. Re- print of: Research Bulletin No. 161. 1949. Agricultural Experiment Station, Lincoln, Nebraska. University of Nebraska Press. p. 93.

-Kermicle J.. L., 1997 Tables and pathways, p. 306 in Mutants of Maize, edited by M. G. NEUFFER, E. D. COE and S. R. WESSLER. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

-Kiesselbach T.A. 1999. The structure and reproduction of corn, 50th anniversary. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

-Luna V.S., J.M. Figueroa, B.M. Baltazar, R.L. Gomez, R. Townsend and J.B. Schoper. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. Crop Sci 41:1551– 1557.

-Mangelsdorf, P. C., Roberts, L.M. & Rogers, J.S. (1981). The probable origin of annual teosintes. Bussey Inst., Harvard Univ. Publ. 10, 1- 69.

-Martinez-Soriano J.P.R. y D.S. Leal-Klevezas. 2000. Transgenic maize in Mexico: No need for Concern. Sci. Vo. 278 (5457): 1399.

-Mondrus-Engle, M. 1981. Tetraploid perennial teosinte seed dormancy and germination. J. of Range Manag. 34(1):59-61.

-Nida, D.L., Patzer, S., Harvey, P., Stipanovic, R., Wood, R., and Fuchs, R.L. 1996. Glyphosate-Tolerant Cotton: The Composition of the Cottonseed Is Equivalent to That of Conventional Cottonseed. J. Agric. Food Chem., 44:1967 -1974.

-Ode J. T., Mag, F., Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35s promoter. Nature 313, 810-12.

-OECD. 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (Zea mays): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Organisation for Economic Co-operation and Development, Environmental Health and Safety Publications. Paris, France.
ENV/JM/MONO(2002)25

-Purseglove, J.W. (1972). Tropical Crops: Monocotyledons 1. Longman Group Limited., London. Raynor, G.S., Ogden, E.C. & Hayes, J.V. (1972). Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. Agronomy Journal 64, 420-427.

-Watson, L. & Dallwitz, M.J. (1992). Grass Genera of the World: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval; including Synonyms, Morphology, Anatomy, Physiology, Phytochemistry, Cytology, Classification, Pathogens, World and Local Distribution, and References. Version: 18th August 1999. http://biodiversity.uno.edu/delta

-Watson, S.A. (1982). Maize: Amazing Maize. General Properties. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Volume II: Part 1 Plant Products. Wolff, I.A. Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL.; pp. 3-29.

-Watson, S.A. (1987). Structure and composition. In Corn: Chemistry and Technology.

-Watson, S.A. and Ramstad, R.E., Eds.; American Association of Cereal Chemists, Inc.: St. Paul, MN; pp. 53-82.

-Wilkes H.G. 1967. Teosinte: the closest relative of maize. Bussey Inst. Harvard Univ. 159 p.

-Wilkes H.G. 1977. Hybridization of maize and teosinte in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. Econ Bot 31:254–293

-WHO (World Health Organization). 1999. International Program on Chemical Safety (IPCS).

-Goggi, A.S., P. Caragea, H. Lopez-Sanchez, M. Westgate, R. Arritt and C: Clark (2006). Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields, Field Crops research.

-Luna, S., Figueroa, J., Baltazar, B.M., Gómez, L.R., Townsend, R. and Schoper, J.B.2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. Crop Sci 41:1551-1557.

Rossi D. (2009) Maíz tolerante a sequía: el evento esperado. www.engormix.com/MA-agricultura/maiz/foros.

Xoconostle-Cazáres B, Ruiz-Medrano R, Cabrera-Ponce JL (2010) Tolerancia a sequías en variedades de maíz. Ciencia y Desarrollo Octubre, 2010 26-27.

Xoconostle-Cazáres B, Gómez-Silva L., Ruiz-Medrano R, (2010) Obtención de nuevas variedades de frijol tolerantes a sequía en México. Claridades Agropecuarias 199: 40-48

IV. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD A LLEVAR A CABO:

IV. a .1 PLAN DE MONITOREO DETALLADO.

Se realizará el monitoreo 400 m alrededor del predio para identificar plantas voluntarias, durante todo el desarrollo del cultivo, pero principalmente durante la fase de cosecha y seis meses después para identificar posibles germinaciones de semillas, cualquier plántula será destruida para evitar su desarrollo.

INSPECCIÓN VISUAL: Se realizará una inspección para identificar fuera del predio a plantas de maíz dentro del límite de 400 metros establecido. Las plantas serán sujetas a detección del cisgen por métodos moleculares.

TRANSPORTE: Las semillas serán transportadas de Irapuato Guanajuato por vía terrestre a Concordia, Sinaloa. Las semillas serán entregadas al Dr. José Antonio Garzón Tiznado, quien coordinará el ensayo experimental. Las semillas estarán

contenidas en triple bolsa sellada y etiquetada de contener material genéticamente mejorado.

ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO: Como se indicó arriba, se pretende desfasar un mes la siembra de maíz para imponer una barrera de tiempo. La siembra se planea para el ciclo OI 2011 y PV 2012.

COSECHA:. Para esa fecha tendremos ubicado el número de mazorcas producidas por planta, mismas que se cosecharán y serán secadas de manera confinada para evitar un posible escape accidental de semilla. Las semillas serán separadas del olote y contadas mecánicamente y pesadas para obtener datos de productividad. Las semillas serán dispuestas en costales de doble bolsa y cosidas en el lugar confinado. Estas serán inactivadas por molienda e incorporadas a los surcos donde se realizó el ensayo experimental. Se solicita permiso para conservar 8 kg para posteriores experimentos. Estas semillas serán transportadas a Irapuato y a la ciudad de México para posterior análisis y confinamiento.

ETIQUETADO: De manera importante cabe destacar el etiquetado de las muestras conteniendo semillas genéticamente mejoradas. Todos los materiales serán utilizados previamente marcados para ese fin y no podrán ser mezclados con aquellos de las plantas no mejoradas.

DISPOSICIÓN FINAL: Las medidas tienen como objetivo el inactivar a la semilla y evitar su propagación intencional o no intencional. El material vegetativo será utilizado como formador de suelo. Cabe aclarar que una parte de la semilla será empacada para su transporte a las instalaciones del Cinvestav Ciudad de México e Irapuato.

IV.a.2 Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación

Se realizará el monitoreo alrededor del predio para identificar plantas voluntarias, durante todo el desarrollo del cultivo, pero principalmente durante la fase de cosecha y seis meses después para identificar posibles germinaciones de semillas, las plántulas serán destruidas para evitar su desarrollo.

INSPECCIÓN VISUAL: Se realizará una inspección para identificar fuera del predio a plantas de maíz dentro del límite establecido de 400 metros.

ANALISIS MOLECULAR: Las plantas que pudieran detectarse serán sujetas a detección del cisgen por métodos de PCR en tiempo real, de acuerdo al procedimiento ya descrito para su detección.

IV.a.3 Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior en la zona de liberación y zonas vecinas, una vez concluida la liberación.

Se pretende realizar el mismo monitoreo cuando concluya el ensayo experimental, desde la recolección de las mazorcas hasta seis meses posteriores a la cosecha. Las plantas voluntarias serán destruidas para evitar su desarrollo y reproducción sexual.

INSPECCIÓN VISUAL: Se realizará una inspección para identificar fuera del predio a plantas de maíz dentro del límite establecido de 400 metros.

ANALISIS MOLECULAR: Las plantas que pudieran detectarse serán sujetas a detección del cisgen por métodos de PCR en tiempo real, de acuerdo al procedimiento ya descrito para su detección.

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.

El predio donde se realizará la siembra es propiedad privada de productores, el arrendamiento incluye la presencia de una barrera física consistente en malla de alambrado. Esta contención impedirá la liberación y dispersión del OGM de manera intencional. Asimismo, se sembrará una barrera perimetral de maíz comercial de la región, el cual aislará físicamente a las plantas GM, que se ubicarán en la región central del predio. En caso de dispersión de OGM fuera de la zona autorizada, nuestra estrategia sistemática de monitoreo alrededor del predio nos permitirá detectarlo y erradicarlo dentro de un perímetro de 400 metros alrededor del predio.

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.

El proceso de implementación de los ensayos incluye protocolos y procedimientos para el control de acceso a los predios donde se ubican los ensayos mediante un registro de entradas y salidas de personal autorizado. El control de acceso será parte de las

responsabilidades del personal de seguridad contratado para asegurar la custodia e integridad del predio experimental.

IV.b.3. MEDIDAS PARA LA ERRADICACIÓN DEL OGM EN ZONAS DISTINTAS A LAS PERMITIDAS.

Como se indicó arriba, se realizará un monitoreo post-cosecha para identificar plantas voluntarias y eliminarlas manualmente.

Monitoreo de plantas voluntarias.

Se realizará monitoreo de plantas de maíz GM en toda el área experimental incluyendo los surcos de bordo del experimento. El monitoreo sobre el sitio experimental se realizará por seis meses posteriores a la cosecha, para eliminar cualquier escape. Las plantas voluntarias identificadas serán eliminadas mediante métodos mecánicos o químicos antes de que lleguen a floración o producción de semilla. Durante la realización de esta actividad el sitio experimental permanecerá perfectamente identificado.

IV.b.4. MEDIDAS PARA EL AISLAMIENTO DE LA ZONA DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM.

Se contará con una malla que limite el predio y además se contará con un plan de contingencia en dos etapas: durante la germinación y durante la cosecha de mazorcas. Este plan consiste en maximizar la vigilancia en referencia a entrada de personal no autorizado y a evitar la recolección de material propagativo, sea plántula o semilla.

Acciones correctivas.

A. Liberación accidental durante el transporte.

Si por accidente durante el transporte se rompen los sacos con triple bolsa de tela de algodón de alto pesaje y se dispersa el material a utilizar en las evaluaciones experimentales, inmediatamente se procederá a la recolección de toda la semilla. Se verificará su peso para cuantificar la posible pérdida. Se identificará plenamente el sitio del accidente y se establecerá un programa de monitoreo por un período de un año para identificar la presencia de plántulas y proceder a su destrucción inmediata por métodos mecánico o químico en caso de tratarse de un área donde puedan germinar y se puedan establecer plántulas de maíz.

B. Liberación accidental durante la siembra.

Si por accidente se realizara la liberación del material experimental en un sitio no autorizado, el incidente se reportará inmediatamente a la autoridad y se procederá a implementar acciones correctivas. Se procederá a recoger la semilla y a pesar el contenido total, con el fin de cuantificar la posible dispersión. Una vez confirmado que la liberación se ha realizado en sitios no autorizados, se procederá a la destrucción inmediata de las plantas establecidas, mediante método mecánico o químico. Se deberá identificar claramente el área donde ocurrió la liberación accidental y realizar un programa de monitoreo posterior durante un año para proceder a la destrucción inmediata de plántulas que logren emerger, mediante el uso de método mecánico o químico.

Una vez que se hayan llevado a cabo las medidas correctivas mencionadas anteriormente, se realizará una revisión para identificar las causas que originaron el problema e instituir los cambios necesarios en las prácticas de manejo o entrenamiento adicional en el personal a fin de evitar que se repita la situación.

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.

Las plantas no presentan un problema de salud; sin embargo, se impedirá que sean utilizadas para consumo humano. Como se describió en los antecedentes, la trehalosa es un azúcar natural que consumimos en nuestros alimentos, además de ser utilizada como aditivo en cosméticos, medicamentos, etc. Como se demuestra en los antecedentes, la acumulación de trehalosa es limitada, considerando que es una molécula señal. Asimismo, como se describe, la trehalosa es inocua de acuerdo a reglamentación de la Organización Mundial de la Salud. Las medidas de protección también consistirán en inactivar a la semilla por molienda, la cual se depositará sobre los surcos donde crecieron las plantas. La semilla triturada no alcanzará las cadenas tróficas.

IV.b.6. MÉTODOS DE LIMPIEZA O DISPOSICIÓN FINAL DE LOS RESIDUOS DE LA LIBERACIÓN

Como se indicó arriba, con excepción de 8 Kg de semilla, éstas serán inactivadas por molienda. La trituración inactivará a la semilla, eliminando así la posibilidad de que sea utilizada para propagación de manera intencional y no intencional. Una parte de la semilla será transportada a las instalaciones del Cinvestav en el DF y en Irapuato.

El material vegetal final, una vez que las mazorcas o grano han sido recolectados a mano, se denomina rastrojo y está constituido por el tallo, la espiga y hojas secas de la planta de maíz. La totalidad del rastrojo será incorporado al suelo mediante las prácticas agronómicas de la región. El rastrojo es material seco que aumentará la capa de suelo agrícola, favoreciendo la siembra siguiente en ese predio. Cabe señalar que la roza y quema de esquilmos agrícolas está prohibida en la zona, por ser una práctica altamente contaminante y detrimental del suelo donde se practica. Por este hecho no se ha considerado como un método de inactivación del material.

MONITOREO DE LA COSECHA

Las mazorcas serán colectadas manualmente y depositadas en canastas previamente marcadas para contener OGMs. Estas serán secadas en instalaciones aledañas al predio, donde se desgranarán, pesarán y contarán mecánicamente.

En la cosecha estarán los proponentes y se observará que:

1. El material que va a ser conservado no se mezcle inadvertidamente con otro material vegetal durante la cosecha.
2. El material a ser removido del sitio de ensayo será etiquetado adecuadamente en forma previa al transporte.
3. Todo el material vegetal remanente se tratará como se describe arriba para que resulte inviable y se procederá a su disposición final en el lugar en que se desarrolló el ensayo.
4. Se registrarán todos los procedimientos en la bitácora de los experimentos dedicada a este fin, incluido el fin de la cosecha.

V. ANTECEDENTES DE LIBERACION DEL OGM EN OTROS PAISES

Este desarrollo biotecnológico fue diseñado y realizado en nuestro Centro de Investigación, bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento e invernadero. Este OGM nunca ha sido liberado a experimentación a cielo abierto. Nuestros resultados de la experimentación, objeto de la presente solicitud nos permitirán realizar

ensayos en otros países donde las plantas tolerantes a sequía provean una solución a limitación del suministro de agua en campos agrícolas.

VI. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RIESGOS DE LAS ALTERNATIVAS TECNOLOGICAS CON LAS QUE SE CUENTE PARA CONTENDER CON EL PROBLEMA PARA EL CUAL SE CONSTRUYÓ EL OGM.

Tolerancia a sequía en variedades de maíz

El maíz es el tercer cereal en importancia a escala mundial y junto con el arroz y el trigo proporciona el 60% de las calorías y las proteínas de la dieta promedio. Los rendimientos del maíz en el mundo desarrollado promedian las 8,2 t/ha mientras que en las zonas tropicales menos desarrolladas oscilan en 3,5 t/ha. En ambos ambientes de producción la sequía es el estrés abiótico más importante, limitando y desestabilizando la producción ya que se producen déficits de agua impredecibles durante el ciclo del cultivo. La variabilidad del suelo también afecta la disponibilidad de agua para las plantas y de la misma pueden resultar variaciones del rendimiento de hasta 10 veces en una campaña relativamente seca (Rossi, 2009).

La mayoría de las 160 millones de hectáreas cultivadas con maíz a nivel mundial se hacen en secano y el déficit hídrico genera pérdidas anuales promedio de un 15% de la producción potencial. La escasez de agua constituye una limitación significativa para el rendimiento en el cinturón del maíz de los EE.UU. en el 20% de los años y las pérdidas serían mayores en los países tropicales que presentan una distribución de lluvias menos uniforme durante el ciclo del cultivo. En tanto, en las zonas templadas donde el riego complementario es más frecuente o las lluvias se distribuyen más uniformemente a través de la temporada las mermas serían menores. En consecuencia, la gran mayoría de los híbridos y variedades cultivadas en condiciones de secano deberían exhibir un alto nivel de tolerancia a la sequía.

Asimismo, la variabilidad de las precipitaciones puede incrementarse como consecuencia de los efectos del cambio climático. A medida que aumenten las temperaturas y los patrones de precipitación cambien, las pérdidas adicionales de maíz pueden acercarse a 10 millones de toneladas por año. Cultivos tolerantes a la sequía y el calor desempeñarán un papel cada vez más importante en la adaptación a esta variación y, a largo plazo, frente a la tendencia hacia un ambiente de producción más

caliente y probablemente más seco. Además, la difusión de cultivares resistentes a estreses abióticos podría permitir el uso y la recuperación de tierras afectadas por salinidad, acidez, desertificación, etc.

Como estimación empírica, alrededor del 25% de las pérdidas atribuidas a la sequía podrían ser superadas por el mejoramiento genético de la tolerancia, otro 25% mediante la aplicación de prácticas agronómicas de manejo del agua, mientras que el 50% restante sólo podrían ser evitadas a través del riego. Sin embargo, las perspectivas de adición de mayor superficie regada para el cultivo de maíz son reducidas, ya que se prevé que el área total de regadío aumente a un ritmo similar o inferior a la tasa de crecimiento demográfico. El crecimiento de la superficie de regadío se dará mayormente en Asia, y será dedicada a cultivos de mayor valor. Además, la agricultura ya utiliza más del 70% del agua dulce consumida a nivel global y su disponibilidad probablemente irá disminuyendo en tanto que la población mundial pasará de los actuales 6,7 a más de 9 millones de habitantes en 2050. Mientras las personas beben de 1 a 3 litros por día, los alimentos diarios requieren entre 2.000 y 3.000 litros para ser producidos. Visto la escasez de agua y su papel crucial en la salud y la agricultura, su uso más eficiente y la tolerancia a la sequía tienen prioridad creciente a medida que se intensifica la competencia por el agua entre las personas y los cultivos. Por lo tanto, para incrementar la producción de granos será necesario recurrir a zonas marginales propensas al déficit hídrico, tanto en las regiones templadas como en las tropicales.Por otra parte, África tiene más de 900 millones de habitantes que representan el 14% de la población mundial, y es el único continente donde la producción de alimentos per cápita está en descenso. Al menos una tercera parte de la población padece hambre y malnutrición y el maíz es un alimento básico para más de 300 millones de personas, particularmente en el África subsahariana. Varios países de esa región a menudo experimentan déficit hídrico en la misma campaña, generando escasez de alimentos a nivel regional que no puede aliviarse por el comercio transfronterizo. El incremento de los precios de los granos y fertilizantes, asociados a la creciente demanda de granos para biocombustibles, agrava aún más el problema. De allí que el maíz tolerante a la sequía podría desempeñar un papel crucial en el cumplimiento de los “Objetivos de Desarrollo del Milenio” de reducir a la mitad para 2015 la proporción de personas que padecen

hambre y pobreza extrema. No obstante, las inversiones públicas en agrobiotecnología deberían acompañarse de políticas que fomenten el desarrollo de sistemas de semillas que permitan a los agricultores aprovechar las nuevas tecnologías a través del acceso a cultivares mejorados y adecuada información sobre los productos. Para que el maíz transgénico tolerante a sequía alcance algo de su potencial en el África subsahariana, donde es desesperadamente necesario, estos cambios deberían producirse a un ritmo acelerado.

Alternativas para encarar el problema

En el cultivo de maíz se vienen realizando fuertes inversiones para aumentar su productividad a través de tres estrategias complementarias: el manejo del cultivo, la generación de híbridos por cruzas convencionales y el mejoramiento via ingeniería genética.

En primer lugar, las buenas prácticas agronómicas tienen al maíz como uno de los cultivos más favorecidos y permitieron aumentar su productividad y mejorar la sustentabilidad. Respecto al mejoramiento genético, éste experimentó un fuerte impulso a partir de la aparición de los híbridos en EE.UU. en la década de 1930. Desde el punto de vista genético, la polinización abierta del cultivo permite un alto grado de heterocigosis, aumentando la posibilidad de mayor tolerancia a estrés tanto biótico como abiótico.

En cuanto al avance de la transgénesis en el cultivo, según el Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA, por sus siglas en inglés), en 2008 la superficie global dedicada a estos cultivares alcanzó 37,3 millones de hectáreas o sea el 30% de las 125 millones de hectáreas de la superficie agrobiotecnológica mundial. Las grandes empresas agrobiotecnológicas han manifestado que tienen la tecnología necesaria para duplicar el rendimiento del cultivo en los próximos 20 años. Entre los caracteres a ser liberados próximamente se mencionan la tolerancia a sequía, resistencia a coleópteros de suelo, eficiencia en el uso del nitrógeno y resistencia al frío, entre otros factores de gran importancia en la definición del rendimiento y su estabilidad.

No obstante, la tolerancia a estreses abióticos son caracteres complejos y una adecuada estrategia de defensiva debería basarse en una serie de adaptaciones que pueden ocurrir a nivel molecular (cambios en la expresión de genes, síntesis de proteínas de

estrés, etc.), y/o a nivel bioquímico (cambios celulares y fisiológicos). Las mismas implicarían factores de transcripción que afectan a numerosos genes o varios genes ligados. Considerando que la ingeniería genética provee de resultados en un tiempo muy corto, la generación de plantas tolerantes a este estrés es una herramienta posible en nuestro país. México cuenta con centros de investigación maduros para diseñar estrategias moleculares, introducirlas a plantas y evaluar en tierras donde ocurrió su diversificación.

Modalidad de la liberación solicitada y las razones de la petición

Se solicita la autorización de la siembra experimental de maíz genéticamente modificado CIEA-9 en campos agrícolas del municipio de Concordia, Sinaloa, con nuestra supervisión y de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en el ciclo agrícola Otoño-Invierno del 2011 y Primavera-Verano 2012. Dicha solicitud está basada en los artículos 32 fracción I, 42 y 43 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (DOF 18-03-2005) y al Titulo Segundo, Capítulo I, Artículos 5, 6 y 7, y al Capítulo II, Artículo 16, del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

Por favor, note que la fecha de siembra que se propone tiene un mes de retraso con respecto al inicio de siembra primavera-verano, con el fin de establecer una barrera temporal de este cultivo experimental con el posible cultivo de especies sexualmente compatibles. Como se detallará adelante, se incluirá una barrera biológica y la siembra estará al menos distanciada por 400 metros de otros cultivos sexualmente compatibles.

Objetivos

El objetivo general de la siembra experimental es evaluar la respuesta de maíz B73 genéticamente modificado con tolerancia a sequía. Esta siembra nos permitirá cuantificar la respuesta mejorada a sequía de maíz y poder comparar los datos ya obtenidos de tolerancia a sequía que se han realizado de manera confinada en nuestras instalaciones.

Los experimentos consistirán de la siembra de maíz B73 Tre y se evaluará la tolerancia a sequía en la fase vegetativa, fase de floración y llenado de grano. La densidad de

siembra será de baja densidad para poder valorar la respuesta fisiológica y molecular de las plantas al estrés hídrico.

Los objetivos particulares de la presente solicitud son:

1. Evaluar la respuesta fisiológica en campo de maíz bajo estrés hídrico en sequía intermedia y severa.
2. Evaluación de la actividad fotosintética de las plantas bajo estrés y en condiciones de humedad.
3. Evaluar la respuesta molecular a sequía de genes que se sobreexpresan en campo abierto en el cultivo de maíz a través de un macroarreglo de genes de respuesta a sequía.
4. Comparar la respuesta fisiológica y molecular bajo estrés y con aporte de agua tanto en condiciones confinadas de crecimiento y en el campo experimental.
5. Evaluar posibles condiciones de estrés abiótico en campo como respuesta a frío.

Problemática del cultivo a abordar y estrategia desarrollada.

Sequía en México

La sequía es una condición normal y recurrente del clima. Se estima que entre 1725 y 1727 perecieron de hambre más de 17 mil personas en Yucatán a causa de las malas cosechas por la falta de lluvias.

Durante la época colonial se registraron un total de 75 periodos de sequía entre 1521 y 1821. Se sabe de prolongadas sequías en el Bajío y en Coahuila que llegaban a durar hasta cinco o siete años. Los alimentos escaseaban y, por tanto, su precio aumentaba. La falta de alimentos era la causa de epidemias entre la población. La presencia de mendigos y desempleados se multiplicaba en las principales ciudades de la Nueva España. Una sequía en particular se ha caracterizado como la más grave del periodo colonial: la ocurrida entre 1785 y 1786, que abarcó casi todo el territorio novohispano.

Fue la más grave crisis agrícola experimentada por los pobladores de la Nueva España. A partir de ella se desató una espiral inflacionaria que duraría 20 años. Estos sucesos, aunados a los descontentos sociales y a los problemas políticos que existían en la

Nueva España y en la metrópoli, fueron factores detonantes en el estallido de la guerra de independencia en los primeros años del siglo XIX.

En los siglos XVII y XVIII se incrementó el poder de los hacendados, quienes guardaban los granos para venderlos más caros en las épocas de escasez. Esto generó problemas de todo tipo que llegaron a involucrar al poder político, a la iglesia ya la sociedad entera. Se sabe que entre 1822 y 1910 hubo un total de 39 periodos secos, aunque se desconoce su duración exacta. En esta época ya se mencionan otros estados del país azotados por las sequías, como Yucatán, Veracruz, Jalisco y Durango, además del Valle de México, Coahuila y el Bajío. Del total de las sequías registradas durante este periodo, las más graves ocurrieron a lo largo de 1849 a 1852 y en 1891 y 1892. Afectaron particularmente la zona norte del país, provocando una carestía de los alimentos básicos y el aumento en los precios del maíz, frijol y trigo.

En la periferia de la ciudad ocurrió un gran número de incendios forestales. Entre ellos se encuentra el ocurrido en el Desierto de los Leones el mes de abril de 1998. La contingencia ambiental ocasionó crisis entre los habitantes de la ciudad debido a la escasez de agua y a los altos índices de contaminación. Una situación similar prevaleció en gran parte del país. Desde 1996 hasta 2003 han sido años deficitarios en lluvias, por lo que desde 1993 y, en buena medida, hasta la fecha ha sido uno de los periodos más drásticos y prolongados de deficiencia de agua. La sequía en muchas partes del norte aún no termina. Los años 208 y 2009 se caracterizaron por sequía extrema en el norte del país, donde el primer ciclo agrícola Primavera-Verano (P-V) fue omitido, mientras que el Otoño-Invierno (O-I) fue retrasado por 10 días.

Los desastres naturales, tales como la sequía en su fase más crítica, constituyen detonadores de situaciones sociales, económicas y políticas preexistentes. En el momento de la emergencia afloran conflictos, relaciones y situaciones que no aparecen con tanta claridad cuando la vida no es alterada por la ausencia o escasez de agua. La recurrencia de este fenómeno es difícil de determinar, y su ocurrencia ha transformado a México de un país exportador en uno importador de maíz. Sus efectos se: transmiten a toda la economía: Aumentan primero los productos agrícolas; enseguida, toda industria que dependa de insumos agrícolas, la de la carne y la de los textiles de lana o algodón aumenta sus costos, y el consumidor finalmente lo resiente en el bolsillo. Degradación

del medio ambiente, desertificación y pobreza entre la población son manifestaciones de este fenómeno. La tercera parte de la población mexicana vive del sector agrícola. Los ejidos con tierras de temporal son susceptibles en extremo. Y puesto que la sequía golpea a todas las empresas, las posibilidades de hallar empleo se reducen y, en consecuencia, el desempleo se generaliza. La prevención es la única manera de mitigar sus efectos. Crear organismos destinados a coordinar actividades tales como el almacenamiento adecuado de granos básicos, hacer un uso eficiente del agua en épocas de abundancia, planes de conservación de la infraestructura y esquemas de difusión que fomente la participación organizada de la sociedad, serán las únicas medidas con las cuales afrontar un fenómeno que natural que se hace presente de manera silenciosa, casi sin darnos cuenta. Asimismo, debe considerarse que la biotecnología es un motor para el desarrollo de nuevas estrategias para dar soluciones al problema lacerante de la sequía, al proveer de nuevas variedades adaptadas a estos cambios climáticos.

Texto tomado del video Las sequías en México, producido por Lázaro Cano y Guillermo Hernández. Supervisión técnica del Dr. Israel Velasco.

2 Martínez Austria, Polioptro F., Efectos del cambio climático en los recursos hídricos de México. Jiutepec, Mor.: IMTA, © 2007. p. 58.

Fenómeno del cambio climático

Por "cambio climático" se entiende un cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos de tiempo comparables (INE, 2008).

De acuerdo a los especialistas que han analizado este fenómeno, cada vez tendremos climas más extremosos y fenómenos climáticos más intensos. En general, los veranos serán más cálidos y los patrones de las lluvias se modificarán, dando lugar a lluvias más intensas en algunas partes y lluvias menos frecuentes en otras, aumentando así las sequías (INE, 2008).

Los especialistas han concluido que el cambio climático es producto principalmente de la actividad humana. El uso intensivo de combustibles fósiles (carbón, petróleo, gasolinas, diesel, gas natural y los combustibles derivados del petróleo) la quema y pérdida de bosques, son de las principales fuentes de este problema (INE, 2008).

Contribución de México a las emisiones globales

Por el volumen total de sus emisiones, México contribuye con alrededor de 1.5% al problema global, en contraste con los grandes emisores históricos: Estados Unidos, Unión Europea y China, que vierten actualmente a la atmósfera más de 17 mil millones de toneladas de CO2, alrededor del 35% de las emisiones globales por año. Son notables también los casos de Indonesia y Brasil que, sólo por deforestación, emiten anualmente casi 5 mil millones de toneladas, alrededor del 10% del total global; sólo por deforestación, Indonesia cuadruplica y Brasil duplica las emisiones totales de México de un año. En contraste, los Estados Unidos de América, la Unión Europea, China, India, Reino Unido, Italia, Francia y España, logran captura forestal por alrededor de 530 millones de toneladas de CO2. (SEMARNAT, 2010).

Evidencias del cambio climático

La principal evidencia es el aumento de la temperatura promedio de la atmósfera terrestre. Sin embargo, existen evidencias relacionadas con el nivel del mar, las cuales están aumentando y por lo tanto disminuyendo las costas, los grandes glaciares en las zonas de los polos, mismas que se están fracturando y licuando, la frecuencia e intensidad de los fenómenos meteorológicos y algunos cambios en los ecosistemas. (IPCC, 2002).

El aumento de la temperatura promedio de la atmósfera terrestre

Cálculos instrumentales por 150 años en el pasado, muestran que las temperaturas en la superficie se han elevado globalmente con importantes variaciones regionales. Para el promedio global, el calentamiento en el último siglo ha ocurrido en dos fases: de la década de 1910 a la de 1940 (0.35ºC) y más drásticamente de 1970 al presente

(0.55ºC). Un rango de incremento se ha visto en los últimos 25 años, y 11 de los 12 años más calientes en registro han ocurrido en últimos años. Arriba de la superficie, las observaciones globales desde 1950 muestran que la tropósfera (arriba de los 10 km) se ha calentado ligeramente más que la superficie, mientras que la estratósfera (de los 10 a los 30 km) se ha enfriado desde 1979. Esto confirma que el calentamiento global proviene del aumento de la temperatura en los océanos, aumentando el nivel del mar, el derretimiento de los glaciares y la disminución de la capa de hielo en el Hemisferio Norte. (IPCC, 2002).

Esto también se ha demostrado por el análisis realizado a muestras de capas de hielo profundas, a fósiles de troncos de árboles y de los registros de temperatura que se tienen de hace más de un siglo.

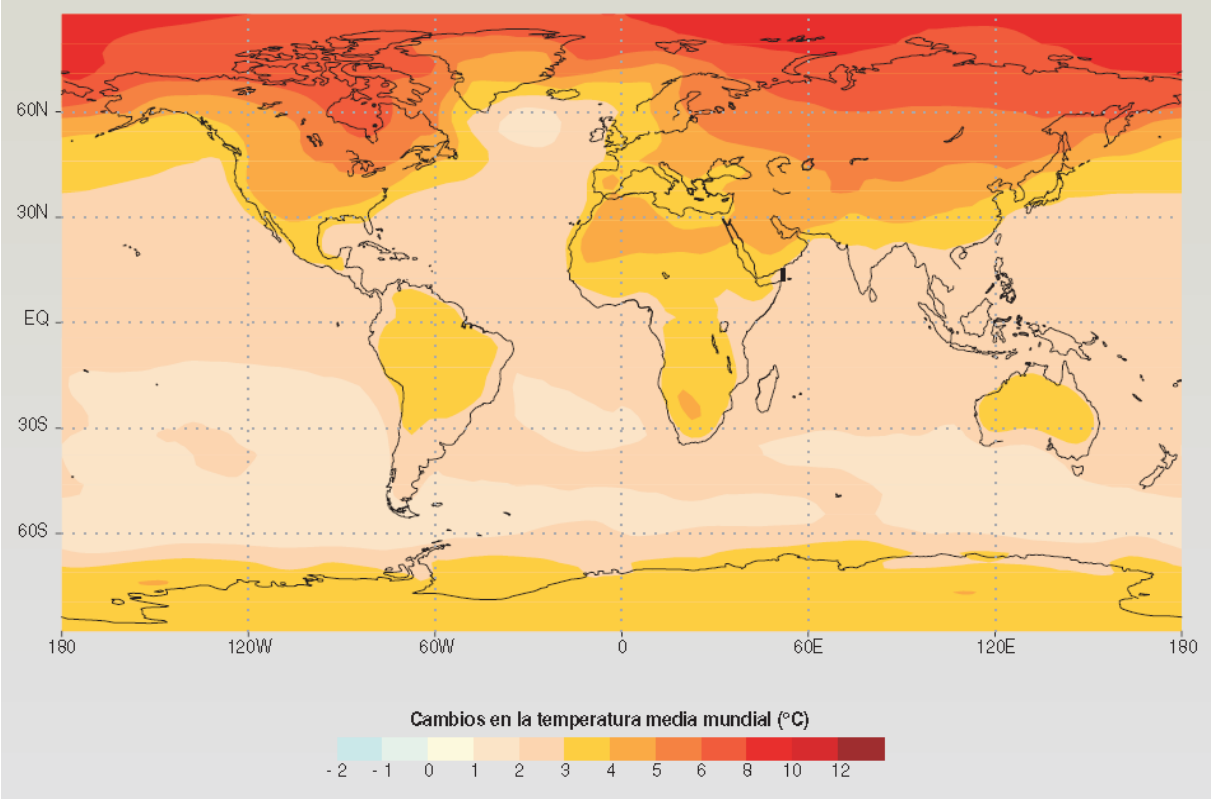

Figura 6. **Cambios en la temperatura media anual según el IEEE.** La figura muestra el periodo 2071–2100 relativo al periodo 1961–1990. Los cálculos se realizaron con simulaciones generales de la circulación atmósfera-océano. El calentamiento medio anual mundial utilizado comprende entre 1,2 y 4,5°C. Tomado de: GRUPO INTERGUBERNAMENTAL DE EXPERTOS SOBRE EL CAMBIO CLIMÁTICO, 2002.

Aumento reciente de los acontecimientos atmosféricos extremos

Las lluvias y tormentas más intensas y las sequías prolongadas que se presentan en la actualidad, son ya parte de la evidencia de que el cambio climático está ocurriendo. Las concentraciones de gases de efecto invernadero se han incrementado rápidamente y ahora son mucho más altas de lo que han sido en los últimos 420 mil años. Las temperaturas promedio globales exceden lo visto en los últimos mil años. La evidencia es irrevocable de que esos cambios son consecuencia de las actividades humanas, pero son subyacentes a las variaciones naturales (IPCC, 2002).

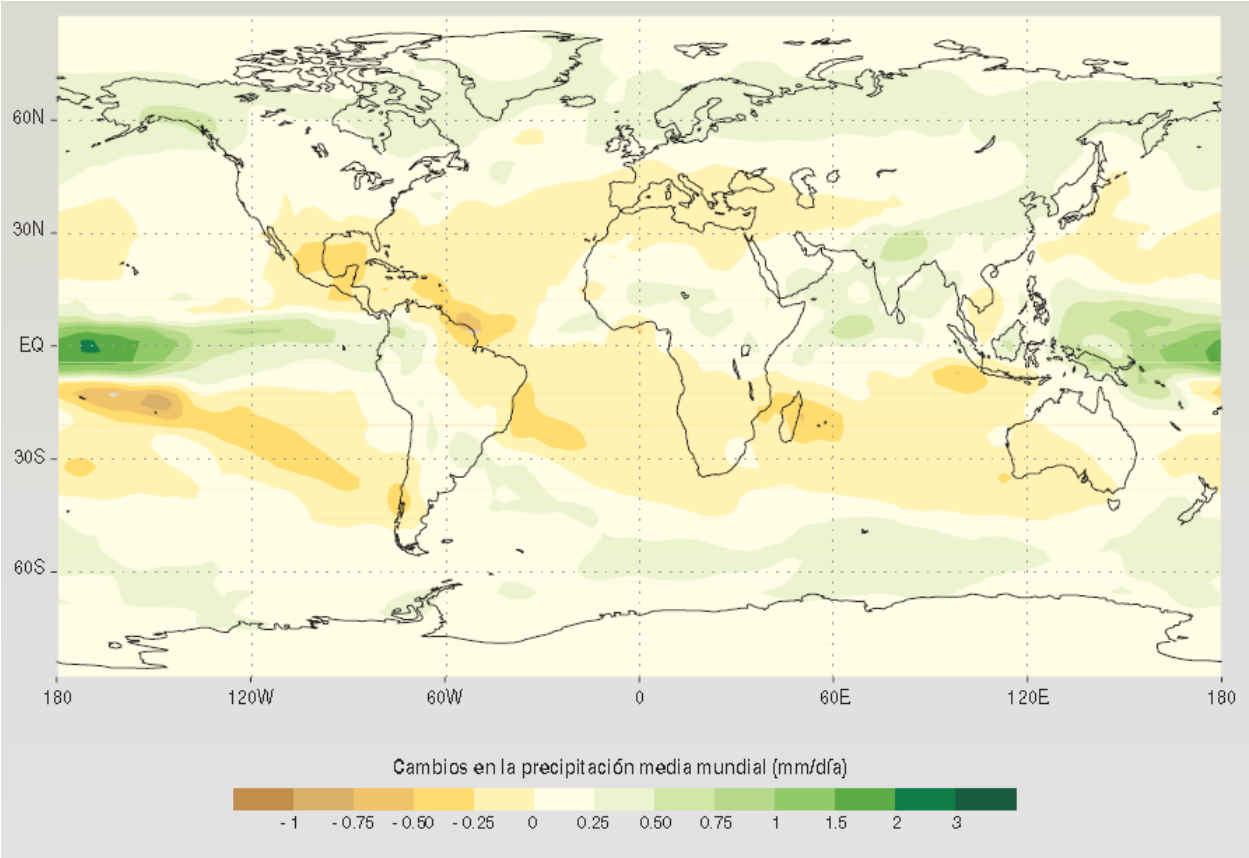

Figura 7. Cambio medio anual de precipitaciones según el IEEE. La figura muestra el periodo 2071–2100 relativo al periodo 1961–1990. Las proyecciones se realizaron con simulaciones generales de la circulación atmósfera-océano. Tomado de: grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático, 2002.

Cambio en el comportamiento de algunas especies animales y vegetales

En muchas partes del mundo, los cambios observados en los sistemas biológicos, ya sean antropogénicos o naturales, guardan relación en diversas localidades y son consistentes con los efectos estimados de los cambios regionales de temperaturas. Dichos sistemas incluyen, por ejemplo, el tiempo adecuado para la reproducción o migraciones, la extensión del periodo de cría, la distribución de las especies y los tamaños de las poblaciones. (IPCC, 2002)

En toda Europa, las mariposas, libélulas, polillas, escarabajos y otros insectos viven ahora en latitudes y alturas superiores, donde anteriormente hacía demasiado frío para que pudieran sobrevivir. En los Alpes, algunas especies vegetales se han desplazado de su hábitat original y ahora pueden encontrarse en zonas más altas (se desplazan 4 metros por arriba de su localización original cada decenio), donde habitualmente no existían, y algunas plantas que anteriormente se encontraban sólo en las cumbres de las montañas han desaparecido. (IPCC, 2002).

Los especialistas han observado cambios inducidos al menos en 420 procesos físicos y comunidades o especies biológica (INE, 2008). Se han observado cambios en el tiempo de acontecimientos biológicos (fenología). La floración anticipada y la extensión de la época de crecimiento de algunas plantas (IPCC, 2002).

A su vez se han detectado cambios en los tipos, intensidad y frecuencia de las alteraciones (por ejemplo, incendios, sequías o fuertes rachas de viento) que se ven afectadas por cambios climáticos regionales y por prácticas en el uso de los suelos y éstas, a su vez, afectan a la productividad y la composición de las especies dentro de un ecosistema, especialmente en altitudes y latitudes altas. También ha cambiado la frecuencia de plagas y brotes de enfermedades, especialmente en sistemas boscosos, y esto se puede vincular a cambios en el clima. Los fenómenos climáticos extremos y su variabilidad (inundaciones, granizos, temperaturas muy frías, ciclones tropicales y sequías) y las consecuencias de algunos de estos fenómenos (por ejemplo, los desplazamientos de los suelos y los incendios) han afectado a los ecosistemas en muchos continentes. (IPCC, 2002).

Fenómenos climáticos, tales como El Niño que se registraron durante el periodo 1997–1998, han tenido grandes impactos sobre muchos ecosistemas terrestres, ya sean

manejados de manera intensiva o no (por ejemplo, la agricultura, los humedales, las zonas de pastoreo y los bosques) han afectado a las poblaciones humanas que se basan en ellos. (IPCC, 2002).

Aspectos generales de la sequía

La sequía, definida como el periodo prolongado de clima anormalmente seco, es un factor que influyen directamente en las actividades humanas (NOAA, 2003).

Con base en una perspectiva multidisciplinaria, la sequía puede ser:

Meteorológica: Es una medida de la precipitación pluvial real y de cuánto se aleja de los valores normales. Debido a que existen diferentes climáticas, la sequía meteorológica es distinta en diferentes sitios geográficos.

- **Agrícola:** Se refiere a la situación en la que la cantidad de humedad en el suelo no cumple con las necesidades para mantener un cultivo en particular.
- **Hidrológica:** Ocurre cuando la cantidad de agua en la superficie y en la sub-superficie se encuentra en volúmenes por debajo de lo normal.
- **Socioeconómica:** Se refiere a la situación que ocurre cuando el bajo suministro de agua comienza a afectar a las poblaciones humanas.

La sequía tiene efectos directos e indirectos sobre diversos aspectos del desarrollo humano. Los impactos económicos de la sequía se observan cuando disminuyen los rendimientos y cantidad de los cultivos, se incrementan los costos de riego, se tienen altas tasas de mortalidad del ganado, disminuyen los costos de las tierras y el desarrollo económico en las zonas afectadas (NDMC, 2003). Un ejemplo de esto son las pérdidas económicas debidas a la sequía en Estados Unidos; tan sólo en el sector agrícola, la sequía provocó en el 40.8% de las pérdidas económicas totales entre 1939 y 1978 (Boyer, 1982). En el año 2009, la sequía que se presentó a nivel mundial impidió la siembra de extensiones de tierra de temporal; tal es el caso de México, donde el periodo de siembra primavera-verano no se realizó, mientras que el otoño-invierno se atrasó dos semanas. Este hecho implicó una disminución sustancial en la producción y por primer año, las reservas de granos en nuestro país fueron ocupadas en su totalidad (SAGARPA, 2009). Además de los efectos económicos, la sequía también impacta sobre el ambiente, por ejemplo, disminuyendo los niveles de agua en sitios de reserva,

incrementando el número de incendios, acelerando la erosión de los suelos y de forma general, ocasionando la pérdida de la diversidad biológica en las zonas afectadas. Debido a las grandes pérdidas que las sequías dejan sobre la humanidad y su entorno, ha surgido un interés progresivo por estudiar sus orígenes y los eventos con los cuales se encuentran asociadas.

Históricamente se han registrado sequías severas, como los que afectaron a la Península de Yucatán en los años 550 a 570 y que han sido relacionados con la desaparición de la civilización Maya (Haug *et al*., 2003). Este estrés abiótico ha sido, entre otros factores, elementos que han promovido la gran diversidad en especies vegetales; tal es el caso del frijol, que tiene dos centros de origen y diversidad y cuenta con más de 2000 variedades.

La sequía en México

En México la región más afectada por la sequía se ubica al Norte, donde predominan el clima árido y semiárido (INEGI, 2003). Aunque esta región ocupa una gran extensión del territorio mexicano, recibe menos del 40% de la precipitación total del país.

Además, en el Norte se ubica el 90% de las plantas industriales y el 70% de las tierras irrigadas, las cuales consumen el 85% del agua disponible (Escalante, 2002).

Aunque el Norte de México se ha caracterizado por su alta vulnerabilidad a la sequía, otras regiones del país han comenzado a ser afectadas por este problema. Dado es el caso de la zona Sur de Veracruz, misma que sufrió su peor sequía en mayo del año 2003, lo que ocasionó la pérdida de 6 mil hectáreas sembradas con diversos productos (Mariscal *et al*., 2003)

A pesar de que la sequía se ha convertido en un problema para México, sólo existen datos registrados de los niveles de precipitación y temperatura diarios provenientes de estados aledaños a Estados Unidos, pero no se realiza un monitoreo sistemático de los índices de sequía a lo largo y ancho de nuestro territorio, con excepción del estado de Chihuahua (CIS, 2003). Por esta razón los datos que se tienen sobre la sequía son aislados y así resulta difícil obtener una imagen completa de este fenómeno en nuestro país.

La sequía y la producción agrícola

Una de las actividades productivas que resulta más afectada por la sequía es la agricultura, debida a que ocasiona grandes pérdidas económicas. Los periodos de sequía pueden dar como resultado pérdidas totales en cultivos anuales, disminución en la calidad de los productos agrícolas, reducción de la productividad de las tierras de cultivo, mayor disponibilidad al ataque de plagas y enfermedades a las plantas, e incrementos en los costos de irrigación (NDMC, 2003). Todo lo anterior impacta directamente sobre el abastecimiento nacional de productos agrícolas.

El impacto de la sequía depende de varios factores, como la intensidad y duración, de la extensión de tierra cultivable afectada, del tipo de cultivo y en general, del aporte de esa región al total productivo nacional (Morehart *et al*., 1999). Las pérdidas en la producción agrícola por sequía son preocupantes; tomando como ejemplo a Estados Unidos, el periodo de sequía del año 2003 provocó pérdidas elevadas en cultivos del Noreste, las cuales ascendieron a 92 millones de dólares tan solo en el cultivo de trigo en Dakota y 123 millones de dólares en maíz; para Wyoming las pérdidas económicas se duplicaron con relación a las del año anterior a la sequía, pasando de 7 millones a 14 millones de dólares (NCDC, 2003).

La irrigación es una práctica que ha contribuido a incrementar los rendimientos en la producción agrícola (Boyer, 1982). El riego puede llegar a ser imprescindible en áreas áridas y semiáridas, pues en esas regiones las tasas de evaporación son elevadas. Por ejemplo, para cultivar alfalfa en Egipto, que tiene 30 mm de precipitación por año, se requieren más de 1500 mm de agua (Díaz y Antón, 2002). Sin embargo, la agricultura de riego puede ser sólo una solución parcial al problema de la baja productividad, pues se requieren grandes cantidades de agua y las fuentes para riego son limitadas y escasas y no están disponibles en todas las regiones, además de que los costos asociados a la infraestructura de riego son elevados. Por tales razones, una buena parte de los cultivos en el mundo se mantienen del agua de lluvia, es decir, dependen de la precipitación y de su distribución en el tiempo.

Dado el panorama mundial se observa que existe una alta demanda de alimentos, sistemas de irrigación que traen consigo elevados costos ambientales y económicos y

una mayor dependencia del ciclo de precipitaciones para mantener los rendimientos agrícolas, por lo cual ha sido necesario buscar alternativas para una agricultura sustentable (Khush, 1999). Una de éstas, basada en el hecho de que la capacidad genética de las plantas es determinante para alcanzar rendimientos favorables bajo condiciones ambientales adversas, consiste en el mejoramiento de plantas con mayor tolerancia a la sequía (CIAT, 2001 a; CIMMYT, 2003). Para explorar las posibilidades de mejoramiento de las plantas es necesario conocer el potencial genético de la diversidad vegetal a través del estudio de las bases biológicas de los mecanismos de respuesta que les permiten a las plantas crecer en ambiente con limitación de agua.

Mecanismos generales de respuesta al estrés por sequía en plantas

Las plantas en su ambiente natural se encuentran expuestas a diversos niveles de limitación de agua, por lo que han adquirido estrategias de adaptación que les permiten, en muchos casos, mantener sus actividades metabólicas a bajos potenciales de agua. Los mejores ejemplos de plantas con alta adaptación a limitación de agua se encuentran en los desiertos naturales, lo que los convierte en sitios con una riqueza única en diversidad biológica (Díaz y Antón, 2002).

La variabilidad de las condiciones de sequía ha conducido a la selección de diversos mecanismos de respuesta al nivel molecular, metabólico y fisiológico (Monneveux y Belhassen, 1996). Las estrategias de adaptación a la sequía dependen de las condiciones climáticas y del suelo, así como de la capacidad genética de la planta; de tal forma que plantas diferentes pueden poseer tolerancia distinta al mismo nivel de sequía (Taiz y Zeiger, 1998).

Se distinguen tres mecanismos generales de respuesta a la sequía según Blum (1999):

Mantenimiento de un alto estatus de agua y el retraso de los síntomas típicos de déficit hídrico. El mantenimiento del estatus de agua en la planta se refiere a la retención de agua en las células y tejidos por varios mecanismos.

Mantenimiento de las funciones de la planta a bajos potenciales de agua, considerando como tolerancia a la sequía.

Recuperación de la hidratación y función a partir de un estatus de agua muy bajo (cercano a la desecación), una capacidad que poseen las plantas de “resurrección”.

Una clasificación más general reconoce dos tipos de mecanismos de respuesta (Ramanjulu y Bartels, 2002):

Evasión del estrés: Puede ser a través de la formación de semillas antes de que la condición de sequía se presente o por adaptaciones morfológicas como el desarrollo de superficies foliares especializadas para disminuir la velocidad de transpiración. Como ejemplos podemos mencionar a las plantas de la familia de las crasuláceas.

Tolerancia al estrés: Es el resultado de la coordinación de alteraciones fisiológicas y bioquímicas a nivel celular y molecular, mismas que permiten a la planta mantener sus funciones bajo el déficit hídrico. En este caso, podemos citar a plantas del desierto y muchas variedades silvestres en ecosistemas con limitación en el suministro de agua.

Bases moleculares de la respuesta a la sequía

De acuerdo a estudios realizados en plantas modelo y plantas de cultivo (Seki *et al*., 2001; Ozturk *et al*., 2002; Yang *et al*., 2004; Way *et al*., 2005), se ha demostrado que las plantas bajo estrés por sequía experimentan cambios en la expresión de genes involucrados en señalización, regulación de la transcripción y la traducción, transporte de agua o con función directa en protección celular (Ramanjulu y Bartels, 2002). También se ha observado que el déficit de agua no sólo es provocado por la sequía; también las temperaturas extremas y la alta concentración de sales producen estrés hídrico, por lo que al nivel molecular las respuestas emitidas poseen puntos de especificidad y puntos de entrecruzamiento (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight y Knight, 2001; Zhu, 2001). Por lo tanto, existen cambios moleculares comunes entre diferentes tipos de estrés.

Asimismo, se observa que la sequía genera estreses secundarios, como estrés nutricional, estrés oxidativo y estrés osmótico, y posee otro nivel de complejidad: es cuantitativa, es decir, está determinada por la inducción de diversos genes que mediante sus productos proteicos confieren a la planta tolerancia al estrés (Bray, 1993).

Regulación a nivel transcripcional

Diversas investigaciones en *A. thaliana* han descrito genes que responden al estrés por deshidratación y cuyos patrones de expresión han permitido la identificación de cuatro sistemas de regulación distintos e independientes en respuesta a la sequía: dos dependientes y dos independientes de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). En estos genes se han localizado elementos de DNA o elementos *cis*-actuantes.

Ejemplos de estos elementos son la secuencia ABRE (elemento de respuesta a ABA) (Marcotte *et al*., 1989), MYCR y MYBR (secuencias de reconocimiento de los factores de transcripción MYC y MYB, dependientes de ABA) (Abe *et al.,* 1997), y DRE (elemento de respuesta a la deshidratación), involucrado en la respuesta independiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994).

Los factores de transcripción o elementos *trans*-actuantes se unen a los promotores de genes inducibles, regulando directamente la respuesta molecular al estrés. En *A. thaliana* y otras plantas se han aislado genes que codifican factores de transcripción que se acumulan en la respuesta al estrés por sequía y salinidad, como factores del tipo *zipper* de leucina o bZIP (Uno *et al*., 2000; Rodríguez-Uribe y O´Connell, 2006), MYC (Abe *et al*., 1997) y DREB (Stockinger *et al.,* 1997; Liu *et al*., 1998). La sobre-expresión de estos factores de transcripción, como DREB1A, aumenta la expresión de genes de respuesta a sequía, produciendo fenotipos con mayor tolerancia a la sequía, salinidad y frío (Kasuga *et al.,* 1999). En plantas de arroz transgénico que sobre-expresan constitutivamente CBF3/DREB1A y ABF3 (genes para factores de transcripción de *Arabidopsis*), se observaron fenotipos tolerantes a sequía y a salinidad, además se identificaron genes blanco que son activados por dichos factores (Oh *et al.,* 2005).

Se han identificado un conjunto de 46 genes que se sobreexpresan en plantas de frijol sometidas a estrés hídrico y que pertenecen a diferentes categorías funcionales. Este arreglo de genes se ha empleado para corroborar su inducción en variedades tolerantes a sequía y que su expresión es baja o se acumulan menos rápido en variedades susceptibles. (Barrera-Figueroa *et al*., 2007 y Montalvo-Hernández *et al*., 2008).

Estos resultados fueron obtenidos en plantas de frijol sometidas a estrés intermedio y severo. Las evidencias experimentales en conjunto señalan que el análisis de la expresión a nivel transcripcional del grupo de genes identificados, es útil como indicador

de la tolerancia a sequía que presentan las plantas. La medición de su sobreexpresión ayudará a la selección de variedades que sean capaces de tolerar niveles de estrés hídrico similares a los presentes en condiciones de campo.

Regulación a nivel traduccional

Existen diferentes moléculas caracterizadas cuya función es mantener el potencial hídrico en plantas, como las acuaporinas que controlan el flujo de agua a través de membranas (Maurel y Chrispeels, 2001), y también juegan un papel importante en la recuperación de las plantas después de la deshidratación, en las etapas cuando se reanuda el crecimiento celular y la actividad fotosintética (Oono *et al*., 2003). Un papel muy importante lo constituye la protección antioxidante, ya que la sequía produce radicales libres. Así tenemos glutatión reductasa, superóxido dismutasa (SOD) (Ruiz-Lozano *et al*., 2001), ascorbato peroxidasa, catalasa (CAT) (Seki *et al*., 2001), glutatión-S-transferasa y glutatión peroxidasa.

Otro grupo de proteínas están asociadas a osmoprotección y plantas transgénicas sobreproductoras de osmolitos toleran mejor la sequía que las plantas control silvestres (Yoshiba *et al*., 1995). La trehalosa-fosfato sintasa juega un rol importante en la señalización por azúcares y ácido abscísico durante el desarrollo vegetativo, y la alta tolerancia a sequía observada en plantas transgénicas puede deberse a estos mecanismo (Iturriaga, 2008). Otras proteínas son responsables del plegamiento, ensamble, translocación y estabilización de proteínas y membranas en organismos bajo estrés abiótico (Wang *et al*., 2004). Se han descrito 5 familias principales de Hsps: la familia Hsp70 (familia DnaK), las chaperoninas (GroEL y Hsp60), la familia Hsp90, la familia Hsp100 (Clp) y la familia de Hsp pequeñas (sHsp). Las proteínas de choque térmico se acumulan en plantas bajo estrés biótico y abiótico. Por ejemplo, PsHsp17.7, una Hsp de frijol se acumula fuertemente en raíces bajo déficit hídrico (Colmenero-Flores *et al*., 1997), al igual que una Hsp70 y su co-chaperona, DnaJ. En variedades de algodón tolerantes a sequía se observó la acumulación fuerte de una proteína de choque térmico que se une a calmodulina (HspCB) (Voloudakis *et al*., 2002). En contraste, las variedades susceptibles al estrés mostraron una inducción menor del transcrito HspCB.

Las proteínas Hsp70 se acumulan también en chícharo en respuesta a sequía (Taylor *et al.,* 2005).

Otros productos codificados por genes inducidos en respuesta a sequía son las proteínas LEA. La expresión de estas proteínas está regulada a nivel transcripcional, y algunas se expresan en respuesta a otros tipos de estrés, como frío y alta salinidad, o en respuesta a ABA exógeno.

La presencia de macromoléculas como mRNA y proteínas en el sistema vascular bajo estrés hídrico; específicamente en células acompañantes y floema maduro, sugiere que las señales asociadas a sequía podrían tener naturaleza sistémica. Adicionalmente, se han encontrado numerosos ejemplos de la presencia de proteínas y/o RNAs detectados en tejido vascular y en la savia del floema en otras plantas, sugiriendo que este es un fenómeno general (Montero-Tavera *et al*., 2008).

Desde el punto de vista básico, la obtención de evidencias experimentales de la naturaleza sistémica de la respuesta a estrés permite explicar la forma en que opera la respuesta tan eficiente y coordinada que tienen unas plantas. Desde el punto de vista experimental, a partir de las listas de genes identificados como sobre-regulados, se han completado los marcos abiertos de lectura (ORFs) de varios genes mediante comparación con las bases de datos de leguminosas y técnicas convencionales de PCR con oligonucleótidos degenerados (datos sin publicar del laboratorio). Las secuencias obtenidas han sido comparadas con las publicadas en la secuenciación del genoma de maíz línea pura B73 y por su homología, pueden ser detectadas con una sonda heterólogas proveniente de frijol.

REPORTES

Los solicitantes reportarán mensualmente las actividades de los predios relacionadas con el protocolo experimental.

MONITOREO DE PLANTAS VOLUNTARIAS

El monitoreo del lugar del ensayo durante el período post cosecha debe comenzar 4 semanas después de cosecha o término del ensayo y debe continuar durante el periodo establecido de seis meses, cuando las condiciones sean favorables para la germinación y crecimiento de plantas voluntarias. El responsable del ensayo, o quien él designe,

deberá monitorear frecuentemente el sitio en el cual se hizo el ensayo para garantizar que las plantas sean identificadas y destruidas.

ROTACIÓN DEL CULTIVO:

En el programa de monitoreo de plantas voluntarias, se utilizarán prácticas agronómicas para favorecer la germinación de semilla que quede en el predio y teniendo como opción el establecimiento de un cultivo diferente al maíz.

Los equipos de investigadores que estarán a cargo de la conducción de los ensayos experimentales con maíz biotecnológico estarán integrados por profesionales adscritos a Universidades o Instituciones de investigación pública con experiencia en las disciplinas relevantes para las propuestas experimentales: especialistas del cultivo de maíz, especialistas en entomología y especialistas en maleza, además de su coordinador general. El principal objetivo de la participación de las instituciones públicas de investigación, en este caso el Cinvestav y nuestros colaboradores en Concordia, es el de asegurar a las autoridades regulatorias que la implementación de las siembras para cumplir con los requerimientos de cada fase regulatoria del proceso en México, se cumple con la mayor transparencia, bioseguridad, integridad, imparcialidad y rigor técnico/científico. De manera que las mismas autoridades regulatorias e industria pueden tener la información y datos necesarios para poder tomar las decisiones de avance del proceso regulatorio de cultivos biotecnológicos en México. Consideramos que la información que se obtendrá es muy valiosa para entender la respuesta de las plantas tolerantes a sequía y frío en un ambiente de estrés natural. Adicionalmente, desde el punto de vista aplicado, es muy importante que se ensayen tecnologías modernas que están impactando positivamente a los sistemas de producción mundial.

La prueba experimental dará cumplimiento a todas las medidas de bioseguridad y los requerimientos regulatorios impuestos por la autoridad regulatoria. Estará en comunicación directa con la contraparte que defina el promovente para dar seguimiento a las actividades de conducción y análisis a las propuestas experimentales.

Como personal de apoyo al trabajo de los especialistas a cargo de las evaluaciones experimentales con maíz biotecnológicos, se contará con la participación del grupo coordinado por el Dr. José Antonio Garzón, quienes poseen preparación académica y experiencia en el manejo del cultivo y estarán a cargo del seguimiento cotidiano de los

ensayos; estarán en comunicación constante con el investigador responsable y los jornaleros a su cargo.

Responsabilidades del personal técnico: Se pretende realizar trabajo diario en el predio, dando cumplimiento a todas las medidas de bioseguridad y requerimientos regulatorios impuestos por la autoridad regulatoria. Observar el desarrollo normal de las actividades y reportar de inmediato las situaciones inesperadas.

La participación de los miembros de los equipos de investigadores en las evaluaciones experimentales con maíz GM se realizará bajo el Convenio respectivo que se establece entre el promovente y la institución de adscripción; en el Convenio se especifican los alcances de la colaboración y las responsabilidades de cada parte; el solicitante del permiso de liberación es el responsable de la conducción de la evaluación bajo las medidas de bioseguridad establecidas por la autoridad.

Anexos a la presente solicitud:

IX DOS COPIAS EN PAPEL DE LA INFORMACION CONTENIDA EN LA SOLICITUD

Se presentan dos copias de la solicitud

X DOS DISCOS CON INFORMACIÓN PÚBLICA.

Se presentan en formato .pdf el presente permiso

XI OCHO DISCOS CON INFORMACIÓN DE CARÁCTER CONFIDENCIAL.

Se presentan en formato .pdf en el presente permiso.

WHO FOOD ADDITIVES SERIES 46:TREHALOSE

First draft prepared by
Dr P.J. Abbott
Australia–New Zealand Food Authority, Canberra, Australia
and
Dr J. Chen
Institute of Nutrition and Food Hygiene, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, China

Explanation

Biological data

Biochemical aspects

Absorption and distribution

Biotransformation and excretion

Toxicological studies

Acute toxicity

Short-term studies of toxicity

Genotoxicity

Reproductive toxicity

Multigeneration studies

Developmental toxicity

Special studies on enzymes used in production of trehalose

Carbohydrase (alpha-amylase) from *Bacillus licheniformis*

Malto-oligosyl trehalose synthase and malto-oligosyl trehalose trehalohydralase

Isoamylase

Cyclodextrin glucanotransferase

Glucoamylase and alpha-amylase from *Bacillus subtilis*

Observations in humans

Studies of tolerance in healthy volunteers

Studies of trehalase-deficient individuals

Estimated dietary intake

Comments

Evaluation

References

1. EXPLANATION

Trehalose is a disaccharide that occurs naturally in insects, plants, fungi, and bacteria. The major dietary source is mushrooms. Trehalose is used in bakery goods, beverages, confectionery, fruit jam, breakfast cereals, rice, and noodles as a texturizer, stabilizer, humectant, or formulation aid with a low sweetening intensity. Trehalose has not previously been considered by the Committee.

2. BIOLOGICAL DATA

2.1 Biochemical aspects

2.1.1 Absorption and distribution

In general, the fate of ingested or parenterally administered trehalose corresponds to that of glucose since trehalose is rapidly hydrolysed to glucose by the enzyme trehalase. Trehalase is found in humans and most animals at the brush border of the intestinal mucosa, as well as in the kidney, liver, and blood plasma (Hore & Messer, 1968; van Handel, 1970; Demelier et al., 1975; Labat-Robert, 1982; Niederst & Dauça, 1985; Eze, 1989; Riby et al., 1990; Yoshida, 1993). Trehalase activity has been found in the small intestine of humans, mice, rats, guinea-pigs, rabbits, pigs, and baboons (Cerda et al., 1972; Hietanen, 1973; Ruppin et al., 1974; Maestracci, 1976; Garland, 1989). No trehalase activity is found in the small intestine of cats (Hore & Messer, 1968; Hietanen, 1973; Garland, 1989).

A very few individuals have trehalase deficiency, which may be hereditary or acquired. However, in Greenland, the prevalence of trehalase deficiency has been reported to be 8%, which is considerably higher than that seen elsewhere (Dahlqvist, 1974; Gudmand-Høyer et al., 1988). The incidence of trehalase deficiency is lower than that of lactase deficiency, which in the United Kingdom is 3.2–6% (Gudmand-Høyer & Skovbjerg, 1996). When trehalose is ingested by such individuals, it is either incompletely digested or undigested, and a small fraction (approximately 0.5%) may be absorbed by passive diffusion, as shown for other disaccharides (van Elburg et al., 1995). The absorbed trehalose may then be metabolized to glucose in the liver or kidney or be excreted unchanged in the urine (Demelier et al., 1975). Unabsorbed trehalose is likely to be fermented by the intestinal microflora to short-chain fatty acids such as acetate, propionate, and butyrate.

In a study of the relative absorption of trehalose and glucose as an indicator of malabsorption, 50 healthy volunteers were given 50 g of trehalose or 50 g of glucose on different days, and the blood glucose concentration was examined before treatment and 15, 20, 60, 90, and 120 min after treatment. The fraction of trehalose absorbed as glucose over the first 60 min was calculated from the ratio of the area under the curve of the concentration of glucose in blood with time after trehalose administration and that after glucose administration. For normal individuals, the observed ratio ranged from 0.3 to 1.5, with a median of 0.7 (Bergoz et al., 1973). An abnormal ratio (< 0.26) was associated with malabsorption resulting from a disease of the small intestine. In a similar study, conducted with nine patients with chronic renal failure, the absorption of trehalose relative to glucose was 0.83 (Pointner et al., 1974).

In a study of the correlation between oral administration of various sugars and exhalation of hydrogen, 60 healthy volunteers received 50 g of trehalose in 400 ml of water. Blood was collected for determination of glucose before treatment and 30, 60, 90, and 120 min after treatment. The reported absorption rate (median, 0.7) indicated that trehalose is incompletely digested to glucose in the small intestine (Heine et al., 1996).

2.1.2 Biotransformation and excretion

Trehalose entering the circulating blood is converted to glucose by trehalase in serum, kidney, liver, and bile, depending on the species (van Handel, 1969; Labat-Robert, 1982; Arola et al., 1999). The trehalose that is not converted to glucose is excreted in the urine of rats, guinea-pigs, and birds, which lack renal trehalase. In mice, rabbits, dogs, pigs, and humans, trehalase in the brush border of the proximal tubular cells of the kidney would be expected to cleave the excreted trehalose to glucose (Demelier et al., 1975; Niederst & Dauça, 1985; Riby et al., 1990).

In a study of the metabolism of absorbed trehalose, groups of rats, guinea-pigs, and rabbits were given an intravenous dose of 0.5 or 1 g/kg bw. In rats, 87% of the administered dose was recovered from the urine, indicating that there is little or no trehalase activity in the liver and kidneys. In guinea-pigs and rabbits, only 7–9% of the administered dose was recovered from the urine. Examination of the trehalose concentration in the renal artery and

vein of rabbits indicated that it was hydrolysed efficiently in the kidneys (Demelier et al., 1975).

In a study of renal trehalase activity, rabbits were given 500 mg of trehalose intravenously, corresponding to 200–300 mg/kg bw. Trehalose was cleared from the plasma within 60 min, and none was found in the urine. In contrast, in rats given 100 mg of trehalose intravenously (for a dose of about 300 mg/kg bw), trehalose was cleared from the plasma at the same rate as in rabbits but was found in the urine in proportion to the plasma concentration. This indicates that no renal metabolism of trehalose occurred in rats (Riby et al., 1990).

In a study of parenteral use of trehalose as a source of saccharide, groups of rabbits were given intravenous doses of trehalose (10% solution), maltose (10% solution), or glucose (5% solution) for 90 min at 6.7 ml/kg bw per h. Blood was collected before treatment and at 30, 60, 90,120, and 180 min. Infusion of trehalose led to a rapid increase in serum glucose concentration that returned to normal 90 min after cessation of infusion. Only about 1% of the infused trehalose was recovered in the urine (Sato et al., 1999).

2.2 Toxicological studies

2.2.1 Acute toxicity

The acute toxicity of trehalose was examined in mice, rats, and dogs. The results are summarized in Table 1, and further details given below.

Table 1. Acute toxicity of trehalose in male and female animals

Species	Route	LD_{50} (mg/kg bw)	Reference
Mouse	Oral	> 5 000	Atkinson & Thomas (1994a)
Mouse	Intravenous	> 1 000	Atkinson & Thomas (1994a)
Rat	Oral	> 16 000	McRae (1995)
Rat	Oral	> 5 000	Atkinson & Thomas (1994b)
Rat	Intravenous	> 1 000	Atkinson & Thomas (1994b)
Dog	Oral	> 5 000	Atkinson & Thomas (1994c)
Dog	Intravenous	> 1 000	Atkinson & Thomas (1994c)

Groups of five male and five female CD-1 mice and Sprague-Dawley rats received a single dose of trehalose at 1 g/kg bw by intravenous injection into the tail vein or 5 g/kg bw by oral gavage. A control group of each species received either intravenous or oral doses of sterile saline at the same volumes. Four male beagle dogs received a single dose of

trehalose at 1 g/kg bw by intravenous injection into the cephalic vein. After a recovery period of 6 days, 5 g/kg bw were administered orally in capsules. All animals of all species were observed twice daily for signs of toxicity, and blood was taken at intervals to determine serum glucose concentrations. In the studies with mice and rats, satellite groups consisting of five animals of each sex per group were treated identically to the treated groups, and blood and urine were collected for analysis of glucose and trehalose.

Mice showed no signs of toxicity after administration by either route, nor were there any treatment-related changes in body weight during the 14-day observation period. Serum glucose concentrations rose slightly but significantly 30 min after oral administration of trehalose but were comparable thereafter. Trehalose was detected in plasma and urine after intravenous administration and in the urine only after oral dosing. The glucose concentration in urine was increased after administration by either route (Atkinson & Thomas, 1994a).

The rats showed no signs of toxicity after administration by either route, nor were there any treatment-related changes in body weight during the 14-day observation period. A slight increase in serum glucose concentration was seen during the first 2 h after oral dosing, but no changes in that in the plasma were seen. Trehalose was detected in plasma and urine after intravenous administration and in the urine only after oral dosing. The glucose concentration in the urine was increased after administration by either route (Atkinson & Thomas, 1994b).

In the dogs, no signs of toxicity were observed after administration by either route, nor were there any treatment-related changes in body weight during the 7-day observation period. Slight but transient changes in serum glucose concentration were seen after administration by either route. Trehalose was detected in the plasma after either route of administration but in the urine only after intravenous administration. The concentration of glucose in urine was increased after administration by either route (Atkinson & Thomas, 1994c).

In a separate study, five male and five female Sprague-Dawley rats were given trehalose orally at a dose of 16 g/kg bw. There were no deaths and no clinical signs of toxicity (McRae, 1995).

Trehalose was instilled at a volume of 0.1 ml of a 10% solution into the right eye of each of six New Zealand white rabbits. The left eye of each animal was used as a control, and each eye was scored for irritation 1, 24, 48, and 72 h after application. The study was terminated at day 4. There were no deaths or signs of systemic toxicity and no evidence of irritation to the cornea, iris, or conjunctivae. Under the conditions of this assay, trehalose was not an eye irritant (Atkinson & Thomas, 1994d).

2.2.2 Short-term studies of toxicity

Mice

In a 14-day study, groups of 10 CD-1 mice of each sex were given trehalose (purity not stated) orally at a dose of 5 g/kg bw per day by gavage, subcutaneously at a dose of 2.5 mg/kg bw per day, or intravenously into the tail vein at a dose of 1 g/kg bw per day. The animals were observed throughout the study, and body weights were recorded and blood collected at intervals for haematological and clinical chemical evaluations. The mice were killed on day 15, and various tissues were preserved for histological examination.

One animal died on day 6 after intravenous dosing, but there had been no clinical signs on previous days, and the findings at necropsy were unremarkable. There were no treatment-related clinical signs of toxicity or treatment-related effects on body weights. Food consumption was normal in all groups. The serum glucose concentration rose slightly after intravenous or subcutaneous treatment but quickly returned to normal. This effect was considered to be transient, and treatment did not lead to accumulation of glucose. The leukocyte counts of males were reduced 14 days after oral or subcutaneous dosing, and this was attributed to a decrease in total lymphocytes. A similar decrease occurred after intravenous dosing but was not statistically significant. There were no accompanying histopathological changes in the bone marrow and no haematological changes in females in any group. Slight increases in sodium and potassium concentrations were seen in males treated by all three routes. The phosphorus concentration was also increased in males after subcutaneous dosing. Males dosed orally had decreased blood urea nitrogen and increased albumin and total protein. Macroscopic changes were observed only in animals treated intravenously, and these were restricted the tail. Histological examination of tissues revealed no remarkable findings (Atkinson & Thomas, 1994e).

Groups of 20 HanIbm.NMRL mice of each sex were fed a pelleted maintenance diet to which trehalose (purity, 99.2%) was added at a concentration of 0, 5000, 15 000, or 50 000 mg/kg (equal to 0, 760, 2200, or 7300 mg/kg bw per day for males and 0, 910, 2700, or 9300 mg/kg bw per day for females) for 13 weeks. The mice were observed daily for clinical signs of toxicity, body weights were measured weekly, and ophthalmoscopic examinations were performed before treatment and at week 13 on control and high-dose animals. Blood and urine samples were collected at 5, 9, and 13 weeks for clinical biochemistry, haematology, and urinary analysis. At 13 weeks, the animals were necropsied, and a range of tissues and organs was collected. Tissue samples from control and high-dose animals and from animals that died during the study were examined histologically.

Two animals in the control group, one at the low dose, and one at the high dose died during treatment, but these deaths were considered not to be related to treatment. There were no treatment-related signs of toxicity and no treatment-related ophthalmoscopic changes. The body weights of male mice at the two higher doses were slightly reduced throughout the study period, but those of mice at the highest dose were significantly reduced only at week 12. The body weights of females were similar in all groups. Haematological parameters were unaffected by treatment, and only sporadic changes were observed. A slight increase in plasma glucose concentration was seen in males and females at the high dose at weeks 5, 9, and 13. In females, this difference was statistically significant at weeks 5 and 9. Animals at the two lower doses also showed a slight increase in blood glucose concentration at weeks 5 and 9, but the difference was statistically significant only in females at the

intermediate dose at week 9. The plasma bilirubin concentration was significantly reduced in males and females at the highest dose during week 5 and in males only in week 9. The plasma calcium concentration was significantly decreased in males and females at the two higher doses at week 13 only. The plasma phosphorus concentration was slightly but significantly increased in males and females at the highest dose at week 5 and in females at the two higher doses at week 9. A slight but nonsignificant increase in plasma phosphorus concentration was observed in both males and females at week 13; however, a treatment-related effect on plasma phosphorus concentration seems unlikely. The plasma potassium concentration could be measured only at week 13 (because of insufficient blood), and a statistically significant decrease was observed in males at the two higher doses and in females at the highest dose. No treatment-related effects were found on urinary parameters.

There were no treatment-related effects on organ weights or appearance. Histological examination of a wide range of tissues revealed no treatment-related effects. While sporadic changes in clinical parameters were observed in this study, they did not show a consistent, treatment-related pattern. The NOEL was 50 000 mg/kg of diet, equal to 7300 mg/kg bw per day, the highest dose tested (Schmid et al., 1998).

Dogs

In a 14-day study, groups of three beagles of each sex were given trehalose (purity not stated) orally at 5 g/kg bw per day by capsule, subcutaneously at 0.25 g/kg bw per day, or intravenously at 1 g/kg bw per day into the cephalic vein. The control group received empty capsules daily for 14 days. The animals were checked daily for signs of toxicity and weighed weekly. Blood was collected for haematology and clinical chemistry.

No deaths occurred during the study, and the animals treated intravenously showed no signs of toxicity. All dogs treated orally had diarrhoea, and one control and two female animals regurgitated the capsule. One male treated subcutaneously had diarrhoea on one occasion. Body weights and body-weight changes were similar in treated and control animals. There was no treatment-related effect on food consumption. The serum glucose concentrations were normal in all groups, except for a slight increase during the first hour after intravenous treatment.

Haematological parameters were normal after oral or subcutaneous treatment. Males showed slight but significant decreases in erythrocyte count, and females had a decreased mean corpuscular volume and mean corpuscular haemoglobin concentration. No significant changes were observed at 14 days. A slight increase in blood urea nitrogen was seen in females treated orally, but as no changes were noted in males treated orally or in males or females treated subcutaneously the significance of this result is questionable. Sporadic macroscopic changes were observed in individual animals, but these were not related to treatment. The histological findings were unremarkable (Atkinson & Thomas, 1994f).

2.2.3 Genotoxicity

The results of tests for the genotoxicity of trehalose are summarized in Table 2.

Table 2. Results of tests for the genotoxicity of trehalose

End-point	Test object	Concentration	Result	Reference
Reverse mutation	S. typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100; E. coli WP2 uvrA	310, 620, 1250, 2500, 5000 µg/plate[a]	Negative	Kitching (1995)
Chromosomal aberration	Chinese hamster ovary cells	1250, 2500, 5000 µg/ml[a]	Negative	Winegar (1997a)
Micronucleus formation	Male and female mice	1250, 2500, 5000 mg/kg bw	Negative	Winegar (1997b)

[a] With and without microsomal activation

2.2.4 Reproductive toxicity

(a) Multigeneration studies

Rats

In a two-generation study, groups of 28 Wistar rats of each sex were fed a pelleted maintenance diet to which trehalose (purity, 99%) was added at a concentration of 0, 25 000, 50 000, or 100 000 mg/kg, equivalent to doses of 0, 1.25, 2.5, and 5 g/kg bw per day. Animals of the F_0 generation were mated after 10 weeks on the diet to produce the F_1 generation and were kept on the modified diet until sacrifice after weaning of the F_1 animals. On post-natal day 4, the litters were culled to groups of four animals of each sex per dose, and on post-natal day 21 the pups were weaned and groups of 28 of each sex were chosen randomly to rear the next (F_2) generation. Animals of the F_1 generation were treated in the same way as the F_0 animals and were mated after 10 weeks to produce the F_2 generation. All animals were observed for clinical signs, and reproductive and clinical parameters were examined in each generation.

No treatment-related clinical signs of toxicity were seen during pre-mating, gestation, or lactation in the F_0 or F_1 animals. Sporadic differences in body weights were seen between groups at various times, but with no dose-dependent relationship; the differences were considered not to be related to treatment. Similar sporadic differences were observed in food consumption but were also considered not to be related to treatment. Macroscopic examination of the parental F_0 and F_1 animals revealed no treatment-related changes, and histological examination of selected tissues revealed no remarkable difference. Fertility and reproductive parameters were normal in each generation, and there were 24, 26, 24, and 27 and 23, 25, 25, and 25 pregnant females in the control, low-, mid-, and high-dose groups of the F_0 and F_1 generations, respectively. There was no treatment-related effect on the fecundity index or the fertility index. The duration of gestation was comparable in all groups, as was the number of liveborn pups. The gestation index was 100% for all groups

of both generations. Significant increases and decreases in litter size were seen between groups in both the F_0 and F_1 generations, but these differences were not dose-related and were not consistent across generations and were therefore considered not to be related to treatment. The sex ratio was comparable in all groups on postnatal days 1 and 21 in both generations. The numbers of small and large pups showed some differences between groups, but these differences were sporadic and considered unrelated to treatment. There were no grossly malformed pups and no abnormal findings at macroscopic examination. There were no treatment-related differences in body weight or body-weight gain between the control and treated groups of the F_0 or F_1 generation. The NOEL was 100 000 mg/kg of diet, equivalent to 5 g/kg bw per day, the highest dose tested (Wolterbeek & Waalkens-Berendsen, 1999a).

(b) Developmental toxicity

Rats

Groups of 28 mated female Wistar rats were fed diets containing trehalose (purity, 99%) at a concentration of 0, 25 000, 50 000, or 100 000 mg/kg, equal to mean dietary intakes of 0, 1.7, 3.5, and 6.9 g/kg bw per day, on days 0–21 days of gestation. The dams were examined throughout the study for clinical signs of toxicity, and their organs were examined macroscopically at the end of the study. On day 21, the dams were killed, and the fetuses from the control and high-dose groups were examined for visceral and skeletal abnormalities.

No deaths occurred during the study, and clinical examination revealed remarkable findings in only two animals, one in the control group and one at the high dose, which had a haemorrhagic discharge from the vagina on days 21 and14 of gestation, respectively. Examination of the organs did not reveal any difference in adverse changes between the treated and control groups. The mean body weights of the treated pregnant animals did not differ from those of the control animals. Food consumption was normal in all groups. No differences between treated and control groups were found in the numbers of corpora lutea, implantations, live and dead fetuses, and early and late resorptions. The rates of pre- and post-implantation loss and the sex ratios of the fetuses were also similar. There were no treatment-related effects on the weights of the reproductive organs weights or on maternal body weights during gestation.

Gross examination of the fetuses revealed a significantly decreased number of large fetuses in dams at the low and high doses and a significantly decreased number of small fetuses in those at the low dose. These differences were likely to be incidental and not related to treatment. One fetus at the low dose had a flexed hindlimb, and one fetus in each of the control and high-dose groups had a filiform tail. No other macroscopic lesions were observed. The mean fetal and placental weights were similar in treated and control animals. Visceral examination of the fetuses in the control and high-dose groups revealed no malformations, and there were no significant differences in the incidences of visceral anomalies and variations. Skeletal examination of the fetuses revealed no malformations in the control or high-dose groups. The incidence of skeletal anomalies and variations was

unremarkabke, and there was no difference in the incidence in the control and high-dose groups. No differences were seen in skeletal ossification, except for a slight but significant difference in the incidence of ossification in the phalanges of the hindlimbs. In the absence of effects at other sites, this difference was considered not to be related to treatment. The NOEL was 100 000 mg/kg of diet, equal to 6.9 g/kg bw per day, the highest dose tested (Waalkens-Berendsen, 1998).

Rabbits

Groups of 16 mated New Zealand white rabbits were fed diets containing trehalose (purity, 99%) at at a concentration of 0, 25 000, 50 000, or 100 000 mg/kg, equal to intakes of 0, 0.77, 1.3, and 2.8 g/kg bw per day, on days 0–7 of gestation, which were reduced to intakes of 0, 0.21, 0.48, and 1.0 mg/kg bw per day on days 21–29 of gestation. On day 29 of gestation, the dams were killed and examined macroscopically, and the fetuses were examined for visceral and skeletal malformations.

There were no treatment-related signs of toxicity in the dams during treatment. Gross examination of the organs and tissues did not reveal any treatment-related changes, and no treatment-related differences in body weight were seen. The food consumption was normal in all groups, but the rate of intake of trehalose decreased in all groups during gestation. The fecundity index was 75, 75, 87, and 81% for the control, low-, mid-, and high-dose groups, respectfully. The numbers of corpora lutea, implantations, live and dead fetuses, early and late resorptions, and pre- and post-implantation losses and the sex ratio of the fetuses did not differ from controls. The organ weights and maternal body-weight changes during gestation were similar in all groups.

Examination of the fetuses revealed no significant differences between controls and treated groups with regard to external findings, placental weight, or fetal weight. Examination of the viscera of the fetuses showed no treatment-related malformations, anomalies, or variations. Examination of the skeleton showed one that fetus in the control group had fused ribs. The incidence of skeletal anomalies was similar between the groups. The only difference in skeletal variations was a significant increase in the incidence of accessory ribs in animals at the intermediate dose. No difference was seen in the high-dose group. Because of the lack of a dose–response relationship and because the difference was seen only on a litter basis, the variation is unlikely to be related to treatment. Incidental but significant differences in variations in skeletal ossification were seen, such as a decrease in the incidence of incompletely ossified thoracal bodies and an increase in the incidence of fetuses with unossified distal epiphyses of the humerus in fetuses at the intermediate dose, but these changes were considered not to be related to treatment. The NOEL was 100 000 mg/kg of diet, equal to 2.8 g/kg bw per day, the highest dose tested (Wolterbeek & Waalkens-Berendsen, 1999b).

2.2.5 Special studies on enzymes used in production of trehalose

(a) Carbohydrase(alpha-amylase) from Bacillus licheniformis

alpha-Amylase (EC 3.2.1.1) obtained from *Bacillus licheniformis* has an ADI 'not specified'[1] (Annex 1, reference *70*).

(b) Malto-oligosyl trehalose synthase and malto-oligosyl trehalose trehalohydrolase

Malto-oligosyl trehalose synthase (EC 5.4.99.15) and malto-oligosyl trehalose trehalohydrolase (EC 3.2.1.141) are obtained from *Arthrobacter ramosus* (Nakada et al., 1995a,b), which is a soil microorganism generally considered to be non-pathogenic. No toxicological studies were available on these enzymes; however, purification of trehalose results in almost complete removal of proteinaceous material.

(c) Isoamylase

Isoamylase (EC 3.2.1.68) is obtained from a mutant strain of *Pseudomonas amyloderamosa*. In a study of acute toxicity, groups of five male and five female mice received a 40% aqueous suspension of isoamylase at concentrations ranging from 12 000 to 21 000 mg/kg of diet. The LD50 was approximately 15 000 mg/kg of diet (Morimoto et al., 1979)

In a short-term study of toxicity, groups of 20 Wistar rats of each sex were given isoamylase by gavage at a dose of 0, 2.3, 5, or 10 ml/kg bw per day, equivalent to 0, 57, 110, or 230 mg of protein per kg bw per day, or 0, 4.1, 8.2, or 16 million units of enzyme activity per kg bw per day. The animals were examined throughout the study for clinical signs, and body weights were measured weekly. Blood was collected at the end of the study for haematology and blood chemistry, and urinary analysis was conducted. Ophthalmoscopic examinations were performed on control and high-dose animals at the beginning and end of the study. All animals were necropsied at 3 months, and selected tissues were taken for microscopic examination.

Five animals died during the study, but the deaths were considered not to be treatment-related, as there were no clinical signs of toxicity in the surviving animals. The results of the ophthalmoscopic examinations were normal. There were no treatment-related changes in mean body weight, and food and water consumption were normal in all groups. A significant increase in haemoglobin concentration was found in females at the low and high doses, but the absence of a dose–response relationship and of other haematological changes suggests that these changes were not treatment-related. There were no other differences between control and treated groups and no significant differences in clinical chemical or urinary parameters between the control and treated groups. At necropsy, no treatment-related changes in absolute or relative organ weights were found, and the only gross pathological changes seen were those associated with gavage. Histopathological examination revealed no changes associated with treatment. The NOEL was 10 ml/kg bw per day, equivalent to 230 mg of protein per kg bw per day (Lina, 1999).

Isoamylase was tested for its ability to induce reverse mutation at the *his* locus in *Salmonella typhimurium* strains TA1535, TA1537, TA98, and TA100, and at the *trp* locus

in *Escherichia coli* WP2*uvr*A with and without metabolic activation, at concentrations of 62–5000 µg of protein per plate. Isoamylase did not cause a reproducible increase in the number of revertants of any of the bacterial strains, with or without metabolic activation (van Delft, 1999).

(d) Cyclodextrin glucanotransferase

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19) is obtained from a strain of *Bacillus stearothermophilus*. Data on the toxicity of cyclodextrin glucanotransferase from other source organisms were considered previously by the Committee in the context of its assessements of the safety of beta-cyclodextrin and gamma-cyclodextrin, and no concern was raised (Annex 1, references *107*, *116*, and *138*). The safety of *B. stearo-thermophilus* as a source organism was considered previously in the context of the evaluation of the safety of alpha-amylase from this organism (Annex 1, reference *94*), in which it was concluded that *B. stearothermophilus* is non-pathogenic to humans and animals.

(e) Glucoamylase and alpha-amylase from Bacillus subtilis

Glucoamylase (EC 3.2.1.3) obtained from *Aspergillus niger* and alpha-amylase from *Bacillus subtilis* were evaluated previously by the Committee (Annex 1, references *77* and *94*). An ADI of 0–1 mg of total organic solids per kg bw was established for glucoamylase (amylglucosidase) from *A. niger,* and an ADI ‘not specified’ was established for alpha-amylase from *B. subtilis*.

2.3 Observations in humans

2.3.1 Studies of tolerance in healthy volunteers

In a study of potential adverse effects, 60 healthy volunteers were given 50 g of trehalose in 400 ml of water after an overnight fast. No abdominal symptoms of diarrhoea were reported (Bolte et al., 1973).

In a study in which 10 volunteers were given a single dose of 25 g of trehalose in 200 ml of water 1 h after breakfast, there was no reported diarrhoea or other abdominal symptoms (Heine et al., 1996).

In an investigation of the laxative dose of trehalose, 20 female students were given a single daily dose of trehalose in 200 ml of solution 2–3 h after a meal. The dose of trehalose was increased gradually from 10 to 20, 30, 40, 50, and 60 g per treatment. The indigestible disaccharide lactulose was used as a positive control. The physical condition and gastrointestinal symptoms of all subjects were recorded before and after treatment. Half of the subjects had no gastrointestinal symptoms, even at the highest dose tested (60 g), whereas lactulose caused diarrhoea in 75% of subjects after ingestion of 40 g. Both trehalose and lactulose caused high prevalences of abdominal symptoms including flatulence, distension, and borborygmus, but the effects of lactulose were significantly more severe than those of trehalose at the same dose. While there was significant variation

between individuals, the threshold dose for transitory laxation was estimated to be 0.65 g/kg bw for trehalose and 0.26 g/kg bw for lactulose (Oku & Okazaki, 1998).

In a study of the absorption of trehalose, 30 healthy adults (15 of each sex) were given trehalose at a single oral dose of 10, 20, 30, or 40 g. The concentrations of hydrogen gas in expired air and of glucose in blood were measured before and every 30 min after administration for 3 h. Subjects were considered to be suffering from malabsorption if the hydrogen gas concentration in expired air increased by more than 20 ppm from the standard value. The subjects were also examined for gastrointestinal symptoms (malabsorption, abdominalgia, laxation, abdominal dysphoria, and crepetus). The rates of malabsorption of trehalose were 0%, 40%, 43%, and 75% at 10, 20, 30, and 40 g, respectively, while the rates of gastrointestinal symptoms were 0%, 40%, 43%, and 50%. Malabsorption was found in more than half of the subjects given 40 g of trehalose. While no racial differences in the ability to absorb trehalose were seen between Mongoloid (Japanese), white, and black individuals, the Japanese had a significantly higher incidence of gastrointestinal symptoms (Ushijima et al., 1995).

2.3.2 Studies of trehalase-deficient individuals

Few cases of heriditary or acquired trehalase deficiency have been reported. The first was that of a women who noted that intake of mushrooms provoked diarrhoea before the end of the meal. A subsequent test for tolerance to trehalose confirmed her intolerance to this sugar, although this may not have been the only cause (Bergoz, 1971). A second case was confirmed by biopsy from the upper jejunum, which showed the absence of intestinal trehalase (Madzarovova-Nohejlova, 1973). Two further cases were reported by Bergoz et al. (1982).

In order to determine whether malabsorption of trehalose causes abdominal symptoms and to establish the most suitable diagnostic tools for distinguishing intolerant from tolerant subjects, a trehalose load test was performed on 64 subjects. The persons were asked to consume 25 g of trehalose after an overnight fast, and blood glucose concentration and hydrogen and methane in the breath were measured. Trehalase activity was measured in a biopsy sample from the duodenum. Of the 19 individuals who were intolerant to mushrooms, 13 experienced flatulence and abdominal distension and six experienced diarrhoea; however, relative trehalase deficiency was detected in only two subjects. The concentrations of gases in breath and of glucose in blood did not differ between the groups. Although the results suggest that symptoms are the best indicator of trehalase deficiency, the study did not include a placebo treatment to allow for over-reporting of intestinal side-effects (Arola et al., 1999).

The incidence of trehalase deficiency is unknown, owing to the limited amount of data, but it has been reported to be 2% (Bergoz et al., 1982). In other studies, however, no cases of intolerance were detected in 123 (Welsh et al., 1978) and 248 subjects (Gudmand-Høyer et al., 1988).

In a study to determine the normal range of trehalase activity in a population in the United Kingdom, duodenal biopsy samples were taken from 400 patients with suspected malabsorption for histological assessment and estimation of trehalase. In 369 patients with normal histological appearance, the distribution of trehalase activity was normal (4.8– 37 U/g protein). One patient had borderline trehalase deficiency. The 31 patients with villous atrophy had a diagnosis of coeliac disease and significantly reduced activity of disaccharidases, including trehalase. When these patients were placed on a gluten-free diet, the activities of maltase, sucrase, and trehalase returned to normal in most, whereas the lactase activity did not recover. The authors concluded that there is no basis for routine determination of trehalase activity in the population of the United Kingdom (Murray et al., 2000),

3. ESTIMATED DIETARY INTAKE

Trehalose has not been approved for use throughout the world, and its intake has not been estimated. However, predictions may be made on the assumption of maximum levels of use in named food categories in combination with reported data on food consumption. The intake of trehalose was predicted for the populations of Australia and the USA.

The intakes predicted in Australia were based on the maximum levels of use in nine food categories, with chewing-gum included as confectionery (Table 3) and on data on food consumption derived from a national nutrition survey of the whole population aged 2 years and over in 1995, comprising 13 858 individual dietary records based on a single 24-h recall. The range of predicted intakes, on the assumption that trehalose is present at the lower and upper limits of the range of concentration, were 5.7–9.7 g/day for all respondents and 6.5–11 g/day for 12 258 consumers only (Australia–New Zealand Food Authority, 2000).

Table 3. Food categories and concentrations reported by the manufacturer and data on food consumption for the whole population (aged ≥ 2 years) of Australia

Food category		Concentration of trehalose (%)	Mean food consumption by all respondents (g/day)
3.1.1	Ice cream	10	16
4.3.4	Fruit and vegetable spreads	10–20	4.8
5	Confectionery	7–20	10
5.4	Icings and frostings	5	0.1
6.1	Whole and broken grains (rice)	2	19
6.4	Flour products (including pasta)	2	14

7.2	Biscuits, cakes, and pastries	5–10	40
9.2	Processed fish	10	0.3
20	Miscellaneous (toppings only)	10–20	1.8

The intakes predicted in the USA were based on the same maximum levels of use in 11 categories of foods (Table 4) and the consumption of these foods in the USA from a dietary survey in 1994–96 (US Department of Agriculture, 1998). In this 3-year national survey, data were collected from two 24-h recalls from representative households. The predicted dietary intakes by children, adolescents, and adults are shown in Table 5. For adults, the predicted intake of trehalose from all proposed uses except chewing-gum was 7.2 g/day at the mean of consumption and 16 g/day at the 90th percentile. The predicted mean intake by eating occasion (excluding extended eating occasions) ranged from 3.9 to 9.7 g per occasion, while the predicted intake at the 90th percentile ranged from 7.6 to 19 g per occasion. The highest predicted intake from an individual food was due to consumption of ice cream. Intake from chewing-gum was estimated separately, as consumption of this commodity was not included in the survey but was based on a postal survey of 1500 individuals in1995 who reported their 1-day intake of regular and sugar-free chewing-gum. It was assumed that trehalose comprised 10% of the total weight of chewing-gum from its use as a non-hygroscopic sweetener in the coating. The predicted mean intake from use of chewing-gum was 0.4 g/day, and that for the 90th percentile of consumption was 0.8 g/day (Murphy & Kruger, 2000).

Table 4. Food uses of trehalose and maximum levels of use in the USA

Food category	Concentration of trehalose (%)	Maximum level of use (%)
Bakery cream	20–25	5–6
Confectionery		7
Cookies		10
Hard candies		20
Ice cream		10
Icings	25	5
Instant noodles/rice		2
Processed fruit (jams, fillings, toppings)		10–20
Restructured sea-food		10

Sponge cake		8–10
Sugar coatings	50	10

Table 5. Predicted intake of trehalose from all proposed uses in food in populations in the USA

Age group (years)	Eating occasion	No. of occasions of use	Intake per user (g)	
			Mean	90th percentile
Children (2–12)	Per day	3251	5.2	11
	Breakfast		3.6	5.8
	Lunch	1072	4.1	7.8
	Dinner	482	4.8	9.2
	Snack	2038	3.7	7.5
	Other	53	5.8	12
Adolescents (13–19)	Per day	866	7.5	15
	Breakfast	221	5.1	10
	Lunch	207	6.6	12
	Dinner	122	7.1	17
	Snack	589	5.2	9.9
	Other	17	5.9	10
Adults (≥ 20)	Per day	6384	7.2	16
	Breakfast	2142	3.9	7.6
	Lunch	1277	6.1	15
	Dinner	1485	8.1	19
	Snack	3084	5.5	12
	Other	121	9.7	16

The predicted mean intake of of trehalose by Australian consumers thus ranged from 6.5 to 11 g/day; the predicted daily intake (including chewing-gum) by adult consumers at the 90th percentile in the USA was < 17 g/day, while the intake per occasion at the 90th percentile could reach 19 g. The Commmittee noted that the predictive models give overestimates of trehalose intake because they assume that all foods in named use categories contain trehalose at maximum levels. In addition, the predicted intakes of high consumers are overestimated by use of 24-h dietary recall records in the food consumption surveys in both Australia and the USA, which tend to overestimate habitual intakes of foods (Institute of European Studies, 1998).

4. COMMENTS

Trehalose is hydrolysed to glucose by the enzyme trehalase, which is located in the intestinal mucosa, and the small amount of intact trehalose that may be absorbed is metabolized by trehalase in the blood plasma, the liver, or the kidney. Trehalase deficiency has been identified in some individuals, but its prevalence appears to be very low in most populations, with the possible exception of that of Greenland, where an 8% prevalence has been reported.

Studies in which trehalose was administered in the diet have been performed in mice and dogs. In a 3-month study in mice, slight, sporadic changes in clinical biochemistry were seen in males at the highest dose tested, 7.3 g/kg bw per day, but there was no evidence of pathological alterations. In a 14-day study in dogs, no clinical or morphological evidence of toxicity was seen at 5 g/kg bw per day, which was the highest dose tested.

In a two-generation study in rats, no effect was found on reproduction. Similarly, in studies of developmental toxicity in rats and rabbits, there was no evidence of teratogenicity. The results of assays for genotoxicity were negative. No long-term studies were available, but these were considered unnecessary since trehalose is rapidly metabolized to glucose at the levels of intake predicted from the proposed uses.

The toxicological data available on the enzymes used in the preparation of trehalose, some of which have been evaluated by the Committee previously, did not raise any concern.

Studies in humans indicate that trehalose is well tolerated. Increased frequencies of malabsorption and gastrointestinal symptoms were noted in individuals consuming single doses of 20 g or more. In the limited data on individuals with known or suspected trehalase deficiency, the only effects seen were the gastrointestinal effects expected of an undigested disaccharide.

The daily intake of trehalose was predicted on the basis of conservative assumptions, by combining the highest proposed levels of use. For adults in the USA, the mean predicted intake from all proposed uses, except chewing-gum, was 7 g/day, and that of consumers at the 90th percentile was 16 g/day. The mean intake per eating occasion ranged from 4 to 10 g, while intake of consumers at the 90th percentile ranged from 8 to 19 g per occasion. Average users of chewing-gum and those at the 90th percentile of use would ingest 0.4 and

0.8 g/day of trehalose, respectively. For Australian adults, the predicted mean intake of trehalose (including chewing-gum) ranged from 6 to 10 g/day. However, the data from both Australia and the USA were based on short-term dietary recall, which tends to result in overestimates of habitual intake.

5. EVALUATION

On the basis of the available information, the Committee established an ADI for trehalose 'not specified'[2].

6. REFERENCES

Arola, H., Koivula, T., Karvonen, A.-L., Jokela, H., Ahola, T. & Isokoski, M. (1999) Low trehalase activity is associated with abdominal symptoms caused by edible mushrooms. *Scand. J. Gastroenterol*., **34**, 898–903.

Atkinson, J.E. & Thomas, B.J. (1994a) An acute toxicity study of trehalose in the albino mouse. Unpublished report No. 434 from Frederick Research Centre, Frederick, Maryland, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Atkinson, J.E. & Thomas, B.J. (1994b) An acute toxicity study of trehalose in the albino rat. Unpublished report No. 435 from Fredrick Research Centre, Frederick, Maryland, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Atkinson, J.E. & Thomas, B.J. (1994c) An acute toxicity study of trehalose in the beagle dog. Unpublished report No. 436 from Frederick Research Centre, Frederick, Maryland, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Atkinson, J.E. & Thomas, B.J. (1994d) An acute eye irritation study of trehalose in New Zealand white rabbits (Study No. 458). Unpublished report No. 458 from Frederick Research Centre, Frederick, Maryland, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland..

Atkinson, J.E. & Thomas, B.J. (1994e) A 14-day toxicity study of trehalose in the albino mouse. Unpublished report No. 459 from Frederick Research Centre, Frederick, Maryland, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Atkinson, J.E. & Thomas, B.J. (1994f) A 14-day toxicity study of trehalose in the beagle dog (Study No. 460), Unpublished report No. 460 from Frederick Research Centre, Frederick, Maryland, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland..

Australia–New Zealand Food Authority (2000) Predicted trehalose intakes based on national food consumption data. Unpublished data submitted to WHO from the Australia–New Zealand Food Authority.

Bergoz, R. (1971) Trehalose malabsorption causing intolerance to mushrooms. *Gastroenterology*, **60**, 9–12.

Bergoz, R., Bolte, J.P. & Meyer zum Bueschenfelde, K.-H. (1973) Trehalose tolerance test. *Scand. J. Gastroenterol*., **8**, 657–663.

Bergoz, R., Vallotton, M.-C. & Loizeau, E. (1982) Trehalase deficiency. *Ann. Nutr. Metab*., **26**, 191–195.

Bolte, J.P., Schönhage, F., Förster, E., Knolle, J. & Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1973) [Trehalose tolerance test in malabsorption syndromes.] *Dtsch. med. Wschr*., **98**, 1358–1362 (in German).

Cerda, J.J., Preiser, H. & Crane, R.K. (1972) Brush border enzymes and malabsorption: Elevated disaccharides in chronic pancreatic insufficiency with diabetes mellitus. *Gastroenterology*, **62**, 841.

Dahlqvist, A. (1974) Enzyme deficiency and malabsorption of carbohydrates. In: Sipple, H.L & McNutt, K.W., eds, *Sugars in Nutrition*, New York: Academic Press, pp. 187–214.

van Delft, J.H.M. (1999) Bacterial reverse mutation test with isoamylase. Unpublished report No. V99.526 from TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland..

Demelier, J.-F., Labat, J. & Courtois, J.-E. (1975) [Influence of parenteral injection of trehalose on mammals with distinct trehalose equipment.] *C.R. Acad. Sc. (Paris) Serie D*, **280**, 669–672 (in French).

van Elburg, R.M., Uil, J.J., Kokke, F.T.M., Mulder, A.M., van de Broek, W.G.M., Mulder, C.J.J. & Heymans, H.S.A. (1995) Repeatability of the sugar-absorption test, using lactulose and mannitol, for measuring intestinal permeability for sugars. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*., **20**, 184–188.

Eze, L.C. (1989) Plasma trehalase activity and diabetes mellitus. *Biochem. Gen*., **27**, 487–495.

Garland, G. (1989) Brush border membrane sucrase–isomaltase, maltase–glucoamylase and trehalase in mammals. *Comp. Biochem. Physiol*., **94B**, 1–11.

Gudmand-Høyer, E. & Skovbjerg, H. (1996) Disaccharide digestion and maldigestion. *Scand. J. Gastroenterol*., **31** (Suppl. 216), 111–121.

Gudmand-Høyer, E., Fenger, H.J., Skovbjerg, H., Kernhansen, P. & Rørbaek Madsen, P. (1988) Trehalase deficiency in Greenland. *Scand. J. Gastroenterol*., **23**, 775–778.

van Handel, E. (1969) Do trehalose and trehalase function in renal glucose transport? *Science*, **163**, 1075–1076.

van Handel, E (1970) Serum trehalase: Assay and normal values. *Clin. Chim. Acta*, **29**, 349–353.

Heine, W., Mohr, C. & Münch, C. (1996) [Sugars as substrates for hydrogen breath tests: Correlations with dosage, orocoeal transit time, microflora and side-effects.] *Pädiatr. Grenzgeb*., **34**, 481–490 (in German).

Hietanen, E. (1973) Interspecific variation in the levels of intestinal alkaline phosphatase, adenosine triphosphatase and disaccharidases. *Comp. Biochem. Physiol*., **46A**, 359–369.

Hore, P. & Messer, M. (1968) Studies on disaccharidase activities of the small intestine of the domestic cat and other carnivorous mammals. *Comp. Biochem. Physiol*., **24**, 717–725.

Institute of European Studies (1998) *The Effect of Survey Duration on the Estimation of Food Chemical Intakes*, IEFS Report No 3.

Kitching, J. (1995) Trehalose (crystal) bacterial mutation assay. Unpublished report from Huntingdon Research Centre Ltd, Huntingdon, United Kingdom. Submitted to WHO by the Flavor and Extract Manufacturers' Association of the United States.

Labat-Robert, J. (1982) Trehalases. In: Lee, C.K. & Lindley, M.G., eds, *Developments in Food Carbohydrate*, Vol. 3, *Disaccharidases*, London: Applied Science Publishers, pp. 84–106.

Lina, B.A.R. (1999) Sub-chronic (13-wk) oral toxicity study with isomylase in rats. Unpublished report No. V99.646 from TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by the Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States.

Madzarovová-Nohejlova, J. (1973) Trehalase deficiency in a family. *Gastroenterology*, **65**, 130–133.

Maestracci, D. (1976) Enzymic solubilization of the human intestinal brush border membrane enzymes. *Biochim. Biophy. Acta*, **433**, 469–481.

McRae, L.A. (1995) Trehalose crystals. Acute oral toxicity to the rat. Unpublished report from Huntingdon Research Centre Ltd, Huntingdon, United Kingdom. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Morimoto, H., Noro, H. & Ohtaki, H. (1979) Acute toxicity test of isoamylase (of *Pseudomonas amyloderamosa* origin). Unpublished report No. 12110175-3 from Japan Food Research Laboratories, Tokyo, Japan. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Murphy, M.M. & Kruger, C.L. (2000) Estimated intake of trehalose in the US based upon proposed use levels in 11 categories of foods. Unpublished report from Environ Corp. Submitted to WHO by Bioresco Inc., Switzerland.

Murray, I.A., Coupland, K., Smith, J., Ansell, D. & Long, R.G. (2000) Intestinal trehalase in a UK population: Establishing a normal range and the effect of disease. *Br. J. Nutr*., **83**, 241–245.

Nakada, T., Maruta, K., Mitsuzumi, H., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. & Tsujisaka, Y. (1995a) Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2215–2218.

Nakada, T., Maruta, K., Tzusaki, K., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. & Tsujisaka, Y. (1995b) Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biosci. Biotech. Biochem*., **59**, 2210–2214.

Niederst, C. & Dauça, M. (1985) [Activities of renal hydrolases during pre- and postnatal development of mice.] *Can. J. Physiol. Pharmacol*., **63**, 731–734 (in French).

Oku, T. & Okazaki, M. (1998) Transitory laxative threshold of trehalose and lactulose in healthy women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **44**, 787–798.

Pointner, H., Flegel, U., Bayer, P.M. & Schmidt, P. (1974) [The trehalose tolerance test in the investigation of intestinal absorption in uraemic patients on intermittent haemodialysis.] *Wien. Klin. Wschr*., **22**, 691–693 (in German).

Riby, J., Sunshine, S. & Kretchmer, N. (1990) Renal trehalase: Function and development. *Comp. Biochem. Physiol*., **95A**, 95–99.

Ruppin, H., Domschke, W., Domschke, S. & Classen, M. (1974) [Intestinal disaccharidase activities in juvenile diabetes mellitus.] *Klin. Wschr*., **52**, 568–570 (in German).

Sato, S., Okamoto, K., Minami, R., Kohri, H. & Yamamoto, S. (1999) Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits. *J. Nutr.*, **129**, 158–164.

Schmid, H., Biedermann, K., Luetkemeier, H., Weber, K. & Wilson, J. (1998) Subchronic 13-week oral toxicity (feeding) study with trehalose in mice. Unpublished report (RCC Project 639213) from Research Consulting Company, Ittingen, Switzerland. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

US Department of Agriculture (1998) *Continuing Survey of Food Intakes by Individuals and 1994–96 Diet and Health Knowledge Survey*, Washington DC: National Technical Information Service.

Ushijima, K., Fujisawa, T. & Kretchmer, N. (1995) Study on digestion and absorption of trehalose in human intestine. *Dig. Absorp*., **18**, 56–57.

Waalkens-Berendsen, D.H. (1998) Oral embryotoxicity/teratogenicity study with trehalose in rats. Unpublished report No. V98.551 from TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Welsh, J.D., Poley, J.R., Bhatia, M. & Sterenson, D.E. (1978) Intestinal dissacharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. *Gastroenterology*, **75**, 847–855.

Winegar, R.A. (1997a) Evaluation of trehalose in the CHO chromosome aberration assay. Unpublished report No. G018-97 from SRI International, Menlo Park, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Winegar, R.A. (1997b) Evaluation of trehalose in the mouse micronucleus assay. Unpublished report No. G019-97 from SRI International, Menlo Park, USA. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Wolterbeek, A.P.M. & Waalkens-Berendsen, D.H. (1999a) Oral two-generation reproduction study with trehalose in rats. Unpublished report No. V99.280 from TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Wolterbeek, A.P.M. & Waalkens-Berendsen, D.H. (1999b) Oral embryotoxicity/teratogenicity study with trehalose in New Zealand white rabbits. Unpublished report No. V98.797 from TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

Yoshida, K. (1993) Serum trehalase activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Chim*. *Acta*, **215**, 123–124.

Endnotes

[1] ADI "not specified" is used to refer to a food substance of very low toxicity which, on the basis of the available data (chemical, biochemical, toxicological and other) and the total dietary intake of the substance arising from its use at the levels necessary to achieve the desired effect and from its acceptable background levels in food, does not, in the opinion of the Committee, represent a hazard to health. For that reason, and for reasons stated in the individual evaluation, the establishment of an ADI expressed in numerical form is not deemed necessary. An additive that meets this criterion must be used within the bounds of good manufacturing practice, i.e. it should be technologically efficacious and should be used at the lowest level necessary to achieve this effect, it should not conceal food of inferior quality or adulturated food, and it should not create a nutritional imbalance.

[2] ADI "not specified" is used to refer to a food substance of very low toxicity which, on the basis of the available data (chemical, biochemical, toxicological and other) and the total

dietary intake of the substance arising from its use at the levels necessary to achieve the desired effect and from its acceptable background levels in food, does not, in the opinion of the Committee, represent a hazard to health. For that reason, and for reasons stated in the individual evaluation, the establishment of an ADI expressed in numerical form is not deemed necessary. An additive that meets this criterion must be used within the bounds of good manufacturing practice, i.e. it should be technologically efficacious and should be used at the lowest level necessary to achieve this effect, it should not conceal food of inferior quality or adulturated food, and it should not create a nutritional imbalance.

See Also:
Toxicological Abbreviations
TREHALOSE (JECFA Evaluation)

.

Health Canada

NOVEL FOOD INFORMATION

Trehalose

NOVEL FOOD INFORMATION

Trehalose

Health Canada has notified Hayashibara International Inc. and Cargill, Inc. that it has no objection to the use of trehalose for human food applications. The Department conducted a comprehensive assessment of this disaccharide according to its *Guidelines for the Safety Assessment of Novel Foods*. These Guidelines are based upon internationally accepted principles for establishing the safety of novel food products.

BACKGROUND:

The following provides a summary of the notification from Hayashibara International Inc., Cargill, Inc. and the evaluation by Heath Canada and contains no confidential business information.

1. Introduction

Hayashibara International Inc. has developed a multi-step enzymatic process to commercially produce trehalose from liquefied starch. The company intends to market trehalose as a nutritive sweetener in various food products. It will be used in food applications as a partial or complete substitute for other sugars or sweeteners.

The Food Directorate has a legislated responsibility for pre-market assessment of novel foods and novel food ingredients as detailed in Division 28 of Part B of the *Food and Drug Regulations (Novel Foods)*. While it is present in small amounts in various food products sold in Canada, it does not have a history of significant consumption as a food ingredient. Since trehalose does not have a history of safe use at levels anticipated in various food applications as proposed by the petitioner, it required a pre-market notification under B.28.002 of the *Food and Drug Regulations*. Trehalose is considered a novel food ingredient based on the following part of the definition of novel foods: "(a) a substance, including a microorganism, that does not have a history of safe use as a food."

2. Product Information

Trehalose (α-*D*-glucopyranosyl-α-*D*-glucopyranoside) is a non-reducing disaccharide that consists of two glucose units linked by a 1,1-α-glycosidic bond. Trehalose exhibits the same technological properties as sucrose with a relative sweetness of 40-45% of that of sucrose. Trehalose is hydrolysed by the enzyme trehalase in the small intestine into two glucose molecules which are absorbed and metabolized. The ingestion, hydrolysis, absorption and metabolism of trehalose is identical to that of all other disaccharides.

Trehalose is found naturally in plants, invertebrates, fungi and microorganism and is therefore present at low levels in a variety of foods available on the marketplace (bread, beer and wine, honey, mushrooms, etc.). However, enzymatically produced trehalose was considered a novel food because the levels of use in various food products is expected to be far greater than previously consumed from natural sources. For commercial production, Hayashibara International Inc. uses a multi-enzymatic process for producing trehalose directly from food-grade starch.

3. Dietary Exposure

Trehalose will provide an additional choice of nutritive sweetener to food manufacturers seeking to optimize or select for various product characteristics. It will be added to the current set of nutritive sweetener candidates such as sucrose, maltose, lactose, high-fructose corn syrup, honey, glucose, etc., or choices of various high, mid, and low gluten flour sources or types.

Hayashibara International Inc. and Cargill, Inc. intend to market trehalose for use in a wide variety of food products ranging from confectionary products to beverages, noodles, fruit purees, and processed meat and seafood. It is to be expected that consumption will reach significantly higher levels compared to the relatively small quantities of trehalose derived from most natural foods today.

4. Nutrition

This disaccharide is enzymatically hydrolysed by the enzyme trehalase in the small intestine into two glucose subunits which are subsequently absorbed and metabolized in a manner similar to maltose. Common disaccharides such as sucrose and lactose are digested through the same physiological process. The sugar provides approximately 4 kcal of food energy per gram as do other digestible sugars and starches. It is therefore important that diabetics understand that it is a sugar and for everyone to understand that it contributes Calories.

The enzyme trehalase is found in human intestinal system and kidneys although its activity varies and it may be missing in some people. In those cases, malabsorption similar to that found with consumption of lactose in lactose intolerant individuals, or sugar alcohols in most people, may be observed. Fewer persons are thought to be trehalase deficient than are lactase deficient.

5. Chemistry/Toxicology

Hayashibara International Inc. provided three genotoxicity studies; four acute toxicity studies with mice, rats and dogs; two 14-day studies with mice and dogs; a 13-week feeding study with mice; two oral developmental toxicity studies with rats and rabbits; and an oral 2-generation study of reproductive toxicity with rats in support of the safety of trehalose. The results of toxicology studies, as well as those on the absorption, metabolism and tolerability of trehalose in humans, indicate that the consumption of trehalose at levels that might be expected from its use as a food ingredient are not of toxicological concern. It is also noted that the studies on trehalose have been evaluated by the Joint Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001) and allocated an acceptable daily intake (ADI) of "not specified."

CONCLUSION:

The safety assessment conducted by Food Directorate determined that there are no safety or nutritional concerns associated with trehalose. Trehalose is a disaccharide of glucose that is fully available to the body as glucose and it meets the definition of "sugars" in the *Food and Drug Regulations*. Therefore, its content in a food must be included in total carbohydrates and as part of the "sugars" value in the Nutrition Facts table. This declaration on the Nutrition Facts table will help inform those consumers who need to know their carbohydrate and/or sugar intake.

Health Canada recommends that Hayashibara International Inc. and Cargill, Inc. develop a voluntary education/communication plan to provide information to diabetics, diabetes educators and other health care professionals who may be consulted by diabetics about the nature of trehalose. Hayashibara International Inc. and Cargill, Inc. should discuss the education/communication plan with Health Canada and keep the Department informed on the progress made by both companies when the plan is implemented.

This Novel Food Information document has been prepared to summarize the opinion regarding the subject product provided by the Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada. This opinion is based upon the comprehensive review of information submitted by the petitioner according to the *Guidelines for the Safety Assessment of Novel Foods*.

(Également disponible en français)

For further information, please contact:

Novel Foods Section
Food Directorate
Health Products and Food Branch
Health Canada
Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario K1A 0L2

Telephone: (613) 941-5535
Facsimile: (613) 952-6400

Food and Nutrition Features

Canada's Food Guide

Bottled Water

Nutrition Labelling

Prenatal nutrition

Food Allergies and Intolerances

Date Modified: 2005-10-14

Top of Page

Important Notices