



PIONEER[®]
A DUPONT BUSINESS

PHI MÉXICO S.A. DE C.V.

INFORMACIÓN NO CONFIDENCIAL

Reporte final de la Liberación Experimental al Ambiente de Maíz
Genéticamente Modificado con el Evento

DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6

Solicitud 095_2010

En la localidad de Cuauhtémoc, Chihuahua

Para la Protección Contra Algunos Insectos Lepidópteros y Tolerancia a Herbicidas
Conteniendo el Ingrediente Activo Glifosato

Febrero de 2011

TABLA DE CONTENIDO

I. Lineamientos del protocolo propuesto para la liberación experimental o en programa piloto.	4
II. Cambios fenotípicos del OGM respecto a su adaptación al área de liberación.....	4
III. Efectos de los genes de selección y posibles efectos sobre la biodiversidad.	4
IV. Caracterización bioquímica y metabólica de todos los productos del gen novedoso con relación a su actividad, productos de degradación o subproductos, productos secundarios y rutas metabólicas.	7
V. Cambios en la capacidad competitiva del OGM en comparación con la contraparte no modificada, incluyendo supervivencia y reproducción, producción de estructuras reproductoras, periodos de latencia y duración del ciclo de vida.....	13
VI. Posibles efectos al ambiente y a la diversidad biológica por la liberación del OGM, incluyendo, el protocolo utilizado para establecer estos posibles efectos.....	13
VII. Efectos de las prácticas de uso y aprovechamiento.....	16
VIII. En su caso, referencia bibliográfica sobre los datos presentados.....	16
PERMISO B00.04.03.02.01.-3742 PARA EVALUAR EL EVENTO DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 EN CHIHUAHUA.....	18
INTRODUCCIÓN.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Localización y características de las parcela.....	20
Material Genético.....	20
Diseño Experimental.	20
Tratamientos.....	21
Variables evaluadas.....	22
Análisis estadístico.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Eficacia biológica.....	27
Organismos no Blanco	31
Rendimiento.	34

Equivalencia Agronómica	35
CONCLUSIONES	37
Eficacia Biológica	37
Organismos No Blanco	37
Equivalencia Agronómica	37
BENEFICIOS POTENCIALES	37
LITERATURA CITADA.....	38

REPORTE DE RESULTADOS CONFORME A LO DISPUESTO EN EL ARTÍCULO 18 DEL RLBOGM PARA EL EVENTO DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 DEL PERMISO DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE CORRESPONDIENTE A LA SOLICITUD 095_2010 PARA EL ESTADO DE CHIHUAHUA.

I. Lineamientos del protocolo propuesto para la liberación experimental o en programa piloto.

Los lineamientos de los protocolos propuestos en esta evaluación se encuentran en el presente reporte en la página 22 de acuerdo al siguiente orden:

- Eficacia Biológica a partir de la página 22.
- Organismos No Blanco a partir de la página 23.
- Equivalencia Agronómica a partir de la página 24.
- Flujo de Polen en el Anexo I.

II. Cambios fenotípicos del OGM respecto a su adaptación al área de liberación.

El estudio sobre los posibles cambios fenotípicos del OGM en el área de liberación se llevó a cabo con el protocolo de equivalencia agronómica. En el presente reporte la equivalencia agronómica fue confirmada y los resultados se presentan a partir de la sección Resultados y Discusión, Equivalencia Agronómica.

III. Efectos de los genes de selección y posibles efectos sobre la biodiversidad.

Respecto al evento DAS-Ø15Ø7-1

El gen de selección empleado durante la transformación para producir líneas de maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 (gen *pat*) que codifica para producir la proteína PAT (phosphinothricin acetyltransferase) confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. El herbicida glufosinato inhibe la glutamina sintasa que sintetiza glutamina de ácido glutámico y amoníaco, lo cual provoca que el amoníaco se acumule en la planta provocando su muerte. La proteína PAT acetila el herbicida glufosinato y lo transforma en acetilglufosinato el cual no es tóxico y con lo cual se confiere la tolerancia de la

planta al herbicida (Figura 1). El herbicida glufosinato es un herbicida no selectivo y controla una gran variedad de malezas.

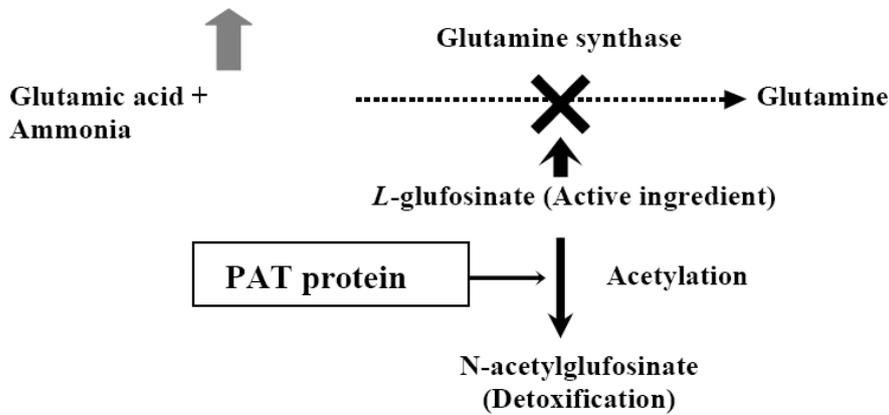


Figura 1. Mecanismo de acción de la proteína PAT

Una planta muere si acumula amoniaco debido a la inhibición de glutamina sintasa causada por el efecto de L- glufosinato, el ingrediente activo del herbicida glufosinato. L- glufosinato es acetilado y se convierte en N-acetilglufosinato debido a la presencia de la proteína PAT y la inhibición de la glutamina sintasa no ocurre y así el amoniaco no se acumula en la planta y esta se desarrolla de manera normal.

La modificación genética para el caso del gen marcador es específica para la producción de la proteína PAT (fosfinotricina acetiltransferasa). No existe producción de ninguna otra proteína heteróloga u otro tipo de molécula que pudiera afectar la biodiversidad, además de que esta reportado que esta proteína es altamente específica para el sustrato L-glufosinato por lo que no presenta ningún efecto adverso en el crecimiento de las plantas y no presenta toxicidad para los animales. El gen de selección usado en la modificación genética solo se expresa manifestando la tolerancia a los herbicidas que contienen al glufosinato de amonio como ingrediente activo. No existe reporte sobre la producción de ninguna substancia, a excepción de la producción de la proteína PAT, que pudiera afectar la vida silvestre.

Respecto al evento MON-00603-6

El segmento de ADN usado para la transformación de maíz es un segmento purificado que no contiene el gen marcador *nptII*. El ADN introducido contiene el gen de interés para tolerancia a herbicida (*cp4 epsps*), este mismo gen se utilizó como gen de selección.

Por pruebas extensivas y la experiencia de su comercialización en Estados Unidos, no hay indicación de que el evento MON-00603-6 comparado con maíz convencional, tenga algún efecto negativo en la biodiversidad. El potencial de daño ha sido evaluado considerando posibles efectos intencionales así como no intencionales de la modificación genética. Varios estudios han demostrado que la proteína CP4 EPSPS solo confiere la tolerancia al glifosato y es segura para el consumo animal y humano. Adicionalmente la equivalencia agronómica ha sido demostrada como se muestra a partir de la página 35 de este reporte. En dicho estudio se observa que los maíces con el evento se comportan agronómicamente igual que su contraparte convencional excepto por la tolerancia a glifosato, por lo que no hay alteraciones en el fenotipo que pudieran afectar a la biodiversidad.

Respecto al evento MON-00810-6

El maíz MON810 fue generado a través de la tecnología de aceleración de partículas usando los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10. El plásmido PV-ZMBK07 contiene el promotor CaMV35S con una región potenciadora duplicada (e35S), un intron del gen de maíz Hsp70, el gen Cry1Ab que codifica para la proteína CRY1AB, la región no traducida nos 3' –a 3' del gen nopalina sintasa, un fragmento operon lac, ori-pUC y el gen *nptII* como marcador de selección. El plásmido PV-ZMGT10 contiene el promoter e35S, el intron Hsp70, peptidos transitorios CPT1 y CPT2, el gen CP4 epsps el cual permite la selección a través de glifosato y el gen gox el cual codifica una enzima para metabolizar glifosato, el terminado nos 3', la región lacZ, ori-pUC y el gen *nptII*.

En la caracterización molecular del maíz MON810, se ha reportado que contiene una inserción simple del evento consistente en los elementos derivados del plasmido PV-

ZMBK07 incluyendo al promotor potenciado 35S, el intron Hsp70 de maíz y una secuencia codificadora Cry1Ab suficiente para codificar una proteína insecticida activa.

Experimentos adicionales confirmaron que el inserto MON810 contiene una porción del extremo terminal 3' del promotor e35S así como una porción terminal 5' de la secuencia codificadora cry1Ab. Los datos indican que no hay presencia de otra porción de DNA del plásmido PV-ZMBK07 y ninguna porción del plásmido PV-ZMGT10 estuvo presente en el maíz MON810. Esto incluye la ausencia del gen marcador de selección *nptII*. En un estudio reciente, el inserto en maíz MON810 fue re caracterizado y se utilizó análisis Southern para confirmar la presencia de una solia copia del inserto, la integridad de los elementos insertados del plásmido PV-ZMBK07, la ausencia de las secuencias del esqueleto del plásmido y la ausencia de los elementos del plásmido PV-ZMGT10.

La organización de los elementos dentro del inserto de maíz MON810 fue confirmada por PCR. El inserto fue secuenciado para reconfirmar la organización de los elementos dentro del inserto. Datos de secuenciación indican que el promotor e35S que regula la expresión del gene Cry1Ab ha sido modificado en una versión promotora más corta denominada e35SMON810, el Hsp70 está intacto y los 2448bp de la secuencia codificadora del Cry1Ab que se encuentran a los lados del centro activo insecticida está presente. Una porción de la terminación 3' del gen cry1Ab así como el terminador *nos* han sido eliminados como resultado de la integración del proceso.

IV. Caracterización bioquímica y metabólica de todos los productos del gen novedoso con relación a su actividad, productos de degradación o subproductos, productos secundarios y rutas metabólicas.

Respecto al evento DAS-Ø15Ø7-1

No es conocido que el maíz con la línea 1507 segregue ninguna sustancia nociva que pudiera tener efectos adversos en el entorno de las plantas y/o microorganismos en el suelo. Asimismo, no se sabe que el maíz produzca ningún aleloquímico después de su muerte que pudiera afectar a otras plantas. Se ha reportado que la proteína Cry1F no funciona como enzima en la planta del mismo modo que las demás proteínas Cry en

Bacillus thuringiensis y también que la proteína PAT posee muy alta especificidad al sustrato L-glufosinato (JBCH, 2002).

Mejoradores de Estados Unidos visitan los campos cada año en donde se realizan siembras con maíz modificado y convencional para la observación de posibles efectos de maíces modificados sembrados en ciclos anteriores sobre los maíces convencionales. Como resultado de la observación, en todos los campos utilizados para el cultivo del maíz con la línea 1507, no se observó un efecto aparente en el crecimiento de los cultivos que podrían ser atribuidas al cultivo del maíz recombinante (JBCH, 2002).

CRY1F

El gen cry1F expresado en el maíz con la línea 1507 está enlazado a un promotor constitutivo, (es decir, resulta en la expresión en todos los tejidos del maíz). La expresión de la proteína Cry1F se determinó a partir de plantas cultivadas en Canadá, USA, Europa y Chile. Los niveles de proteína Cry1F detectada en maíz cultivado en esos lugares muestra un rango de valores. Cabe mencionar que se podrían esperar diferencias en la expresión de la proteína debido a las diferencias en el clima y en el medio ambiente en esos lugares. Los valores oscilaron entre 61 a 348 pg de proteína Cry1F por μ g en proteínas vegetales de hoja, de 126 a 190.5 pg de de proteína Cry1F por μ g de proteínas en el polen de la plantas, de 37 a 133 pg de proteína Cry1F por μ g de proteína vegetal en la seda, de 550 a 1450 pg de proteína Cry1F por μ g de proteína vegetal en el tallo y de 89.8 a 116 pg de proteína Cry1F por μ g de proteína vegetal en grano (CFIA, Oct 2002).

Además, la proteína no es probable que se presente en el agua potable porque la proteína se despliega en cantidades minúsculas en la planta. También se determino la dependencia del tiempo en la pérdida de la biodisponibilidad de la proteína tras la incorporación Cry1F en un suelo típico de cultivo de maíz esta se determinó en condiciones de laboratorio (Halliday, 1998). Los resultados de este estudio indican que cuando la proteína Cry1F se aplica el suelo muestra una disminución 20 veces mayor en la actividad biológica en los 28 días de periodo de prueba. La estimación de la DT50 fue 3.13 días. Estos resultados son consistentes con los de la proteína Cry1A (b) utilizando básicamente el mismo diseño experimental, en donde se reportó una DT50 de 1.6 días. (USDA/APHIS, 2001)

La proteína Cry1F ha mostrado que se degrada fácilmente en el medio ambiente. Se encontró en los experimentos de degradación de la proteína Cry1F en los suelos, que tiene un valor de DT50 (tiempo para degradar el 50% de las propiedades insecticidas original), de 3.13 días. Las proteínas alergénicas son normalmente resistentes a la digestión y el tratamiento térmico, a diferencia de la proteína Cry1F que ha demostrado que se degrada fácilmente en el fluido gástrico simulado (digerido dentro de 1 minuto a una proporción molar de 1:100 Cry1F: pepsina), y se desactiva después de la exposición a 75°C durante 30 minutos (CFIA, Oct 2002).

Adicionalmente en estudios realizados sobre la composición nutricional del maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 y su contraparte convencional realizado en el laboratorio de Pioneer Hi-Bred Int en Estados Unidos, no hubo diferencias estadísticamente significativas en 42 de 50 analitos evaluados entre la línea DAS-Ø15Ø7-1 y su contraparte convencional. En donde se observaron diferencias, los valores de estos componentes nutricionales se encontraron dentro de los valores normales reportados en la literatura para maíz convencional o ligeramente fuera de rango. Los estudios demuestran que al no haber alteración en la composición nutrimental no hay alteraciones en las rutas metabólicas de las plantas con el evento DAS-Ø15Ø7-1 (JBCH, 2002).

Referencias:

CFIA. Oct 2002. Decision document DD2002-4198-22: Determination of the Safety of Dow AgroSciences Canada Inc. and Pioneer Hi-Bred International's Insect Resistant and Glufosinate - Ammonium Tolerant Corn (*Zea mays* L.) Line 1507. Canadian Food Inspection Agency, Plant Health and Production Division, Plant Biotechnology Office, Ottawa.

JBCH. 2002. Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for DAS-Ø15Ø7-1. Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment.

EFSA. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (reference EFSA-GMO-NL-2004-02) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for food use, under Regulation (EC)

No 1829/2003 from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds The EFSA Journal (2005) 182, 1-22.

USDA/APHIS. 2001. Decision on Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International, Inc. Petition 00-136-01P Seeking a Determination of Nonregulated Status for Bt Cry1F Insect Resistant, Glufosinate Tolerant Corn Line 1507. Animal and Plant Health Inspection Service and U.S. Department of Agriculture.

Respecto al evento MON-00603-6

Los análisis de expresión de proteínas realizado en varios estudios han demostrado que la única nueva proteína producida por la modificación con el evento MON-00603-6 es CP4 EPSPS y la variante más cercana CP4 EPSPS L214P la cual difiere de CP4 EPSPS por un aminoácido

El gen que codifica a la proteína CP4 EPSPS ha sido completamente secuenciada y codifica una proteína de 47.6 kDa consistente en un único polipéptido de 455 aminoácidos. A nivel de aminoácidos, esta enzima es similar a otras proteínas CP4 EPSPS en esta familia de proteínas con una función común en plantas y microorganismos. La similitud de la proteína CP4 EPSPS a otras proteínas EPSPS naturalmente presentes en una gran variedad de alimentos derivados de plantas y microbios muestran evidencia de la seguridad de esta proteína.

En estudios realizados en Estados Unidos sobre comparación nutricional entre maíces con el evento MON-00603-6 y su contraparte convencional demuestran que no hay diferencias significativas entre estos. Pequeñas diferencias no fueron consideradas siendo que los niveles cayeron dentro de los rangos normales publicados para variedades de maíz comerciales. Los estudios demuestran que al no haber alteración en la composición nutricional no hay alteraciones en las rutas metabólicas de las plantas con el evento MON-00603-6

Referencias:

Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K. and Hallas, L. (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants, pp 139-145. In Biosynthesis

and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants, Singh et al. (eds), American Society of Plant Physiologists.

Watson, S.A., (1987). Structure and Composition, pp. 53-82. In Corn: Chemistry and Technology. S.A. Watson and P.E. Ramstad, (Eds.), American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

Center for environmental risk assessment. International Life Sciences Institute (ILSI). Research Foundation. <http://cera-gmc.org/docs/decdocs/02-269-007.pdf>

<http://cera-gmc.org/docs/decdocs/02-269-007.pdf>

Respecto al evento MON-ØØ81Ø-6

Material de grano de parcelas experimentales en Estados Unidos en 1994 fueron analizadas para proximales (humedad, proteína total, grasa total, calorías, carbohidratos, fibra cruda y cenizas) y 44 constituyentes específicos de maíz (aminoácidos, ácidos grasos, almidón, azúcares, calcio, fósforo, tocoferol y ácido fítico). En 11 de los compuesto estudiados, los niveles de 8 aminoácidos, la fibra cruda, el calcio y el tocoferol fueron significativamente más altos en el maíz MON810 que en su control convencional (MON818). Sin embargo para 8 de estos compuestos, las concentraciones en maíz MON810 y su control convencional estuvieron dentro de los rangos reportados como normales en la literatura. El nivel de histidina y cistina fueron más altos que los reportados en la literatura en ambos materiales estudiados (maíz MON810 y su control convencional)

Por otro lado los niveles de calcio en ambos materiales estuvieron por debajo de los niveles reportados en la literatura para maíz. Sin embargo, notablemente, los niveles para los 3 compuestos no estuvieron fuera de los resultados reportados que el solicitante ha reportado que pueden ocurrir en la contraparte convencional. Treinta y seis compuestos fueron analizados en los granos colectados en las pruebas experimentales en Francia en 1995 (proximales, aminoácidos y ácidos grasos), pero de estas pruebas experimentales también fueron analizados proximales en forraje. En este material fueron observadas diferencias significativas en los niveles constitutivos entre maíz MON810 y su control convencional para 5 compuestos (incremento en humedad

de grano y contenido de ácido palmítico, niveles reducidos de metionina y triptófano, así como incremento de proteína cruda en forraje)

En base al análisis tanto en forraje como en granos de maíz MON810 y de maíz control no transgénico cultivados en parcelas experimentales durante dos ciclos, la EFSA concluye que no se detectaron cambios composicionales significativos en maíz MON810 cuando es comparado con su control no transgénico. En la presente evaluación el panel GMO de la EFSA consideró los datos completos del estudio composicional proporcionado por el solicitante y publicado por investigadores independientes después de que la autorización comercial del maíz MON810 fue concedida, y se concluye que el maíz MON810 es composicionalmente equivalente a sus contrapartes convencionales excepto por la presencia de la proteína Cry1Ab (Autran, *et al.* 2003)

Los estudios demuestran que al no haber alteración en la composición nutrimental no hay alteraciones en las rutas metabólicas de las plantas con el evento MON-ØØ81Ø-6 .

Referencias:

Autran, J.-C., Bénétrix, F., Bloc, D., Burghart, P., Chaurano, M., Combe, N., Melcion, J.-P., 2003. Composition and technological value of genetically modified and conventional maize (*Zea mays* L.) grains. *Sciences des aliments*, 23: 223-247.

EFSA. 2009. Applications (EFSA-GMO-RX-MON810) for renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or containing maize MON810, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize MON810, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *The EFSA journal* 1149, 1-85.

Lemaux, P.G., 2009. Genetically engineered plants and foods: a scientist's analysis of the issues (Part II). *Annual Review of Plant Biology*, 60: 511-559.

Priestley, A.L., Brownbridge, M., 2009. Field trials to evaluate effects of Bt-transgenic silage corn expressing the Cry1Ab insecticidal toxin on non-target soil arthropods in northern New England, USA. *Transgenic Research*, 18: 425-443.

Scientific opinion on applications for renewal of authorisation for the continued marketing of maize MON810 and existing derived food and feed products The EFSA Journal (2009) 1149, 15-85.

V. Cambios en la capacidad competitiva del OGM en comparación con la contraparte no modificada, incluyendo supervivencia y reproducción, producción de estructuras reproductoras, periodos de latencia y duración del ciclo de vida.

No se observaron cambios estadísticamente significativos cuando se realizó la comparación agronómica entre el maíz genéticamente modificado y su contraparte convencional. Por lo que se comprueba que el maíz DAS-Ø15Ø7-1 xMON00810-6xMON-ØØ6Ø3-6 es equivalente agronómicamente a su contraparte convencional. Los resultados de la comparación agronómica se encuentran en este reporte en la sección de Resultados y Discusión.

VI. Posibles efectos al ambiente y a la diversidad biológica por la liberación del OGM, incluyendo, el protocolo utilizado para establecer estos posibles efectos

Respecto al evento DAS-Ø15Ø7-1

El historial en el uso, así como la literatura sugieren que las proteínas Bt nos son toxicas para humanos, otros vertebrados e insectos benéficos.

La EFSA ha evaluado estudios específicos llevados a cabo en pruebas de campo con insectos no blanco de la tecnología, incluyendo larvas de abeja y adultos, himenópteros parasitoides, crisopas, mariquitas, lombrices, colémbolos, etc. En todos los caso no se observaron efectos adversos.

Un estudio adicional se llevo a cabo sobre el efecto de Cry1F en larvas neonatas de mariposa monarca en donde se alimentaron con una dosis de 10,000 ng/mL. Se tomo el peso de las larvas en primer instar así como la mortalidad después de 7 días de la alimentación. A pesar de que hubo una inhibición del crecimiento, no se presento mortalidad de las larvas con esta dieta. Dosis de polen equivalentes a 10,000 ng/mL en la dieta no es probable que se encuentren en hojas en la naturaleza, se concluye que la proteína Cry1F no presenta un riesgo para la monarca.

La secuencia de la proteína transgénica Cry1F no muestra ninguna similitud significativa con las secuencias de alérgenos conocidos.

De acuerdo a los datos obtenidos el panel de la EFSA es de la opinión de que no se necesitan estudios adicionales de toxicidad crónica ni pruebas en otras especies de animales blancos y que el evento DAS-Ø15Ø7-1 no presenta efectos adversos al medio ambiente o a la biodiversidad.

El estudio de los posibles efectos al ambiente y la diversidad biológica en cuanto a enfoque de organismos no blanco se encuentran en el capítulo III, página 31 del reporte de resultados correspondiente al permiso B00.04.03.02.01.8938 de la solicitud 004_2009. No se observó ningún efecto negativo en los insectos que no son blanco de esta tecnología.

Respecto al evento MON-ØØ6Ø3-6

Los análisis de expresión de proteínas realizado en varios estudios reportados han demostrado que la única nueva proteína producida por la modificación con el evento MON-ØØ6Ø3-6 es la proteína CP4 EPSPS y la variante más cercana CP4 EPSPS L214P la cual difiere de CP4 EPSPS por un aminoácido. El gen que codifica a la proteína CP4 EPSPS ha sido completamente secuenciada y codifica una proteína de 47.6 kDa consistente en un único polipéptido de 455 aminoácidos. A nivel de aminoácidos, esta enzima es similar a otras proteínas CP4 EPSPS en esta familia de proteínas con una función común en plantas y microorganismos. La similitud de la proteína CP4 EPSPS a otras proteínas EPSPS naturalmente presentes en una gran variedad de alimentos derivados de plantas y microbios muestran evidencia de la seguridad de esta proteína.

Datos generados para el registro de herbicidas conteniendo glifosato y casi 30 años de experiencia con este demuestran que este herbicida no ha causado daños irracionalmente adversos en humanos, mamíferos y otros organismos no blanco bajo condiciones de uso normal. Adicionalmente los datos demuestran que con el uso de estos herbicidas en maíz, no se espera que causen daños irracionalmente adversos al medio ambiente.

Respecto al evento MON-00810-6

No existen receptores para las proteínas delta-edotoxinas de las subespecies *Bacillus thuringiensis* sobre la superficie de células intestinales de mamíferos, además los humanos no son susceptibles a estas proteínas (Sacchi et al., 1986; Hofmann et al., 1988b; Noteborn et al., 1995). En adición a la falta de receptores para las proteínas Bt, la ausencia de efectos adversos en humanos es además apoyada por numerosas revisiones en la seguridad de las proteínas Bt y la larga historia del uso de productos Bt microbianos (Ignoffo, 1973; Shadduck, 1983; Siegel and Shadduck, 1989; McClintock et al., 1995).

El historial en su uso y la literatura sugieren que las proteínas bacteriales Bt no son tóxicas para humanos, otros vertebrados e insectos benéficos. El centro activo insecticida de la proteína Bt expresada en el maíz MON 810 (Cry1Ab) muestra ser equivalente a la proteína microbiana original. Esta proteína es activa solamente contra insectos lepidópteros específicos.

Por otro lado la proteína Cry1Ab no muestra homología con proteínas que se conocen son tóxicas para humanos y para otros mamíferos y/o alergénicas. Adicionalmente esta proteína es degradada rápidamente bajo condiciones gástricas simuladas. Además la proteína Cry1Ab ha sido extensamente evaluada en diversas opiniones por el panel OGM de la EFSA. No se encontraron riesgos para humanos o animales de la proteína Cry1Ab.

En estudios de 90 días de alimentación en ratas, no se observaron indicaciones de efectos adversos. Adicionalmente un estudio de alimentación de pollos de 42 días proporciono evidencia de la equivalencia nutricional entre el maíz MON810 y su control convencional. Además el panel GMO de la EFSA opina que el maíz MON810 es tan seguro como su contraparte convencional en cuanto a alergenicidad y que la alergenicidad de la planta en total no cambia con la modificación genética. En conclusión el panel de OGM's de la EFSA considera que el maíz MON810 es tan seguro como su contraparte convencional con respecto a efectos potenciales en la salud humana y animal. El panel también concluye que es improbable que el maíz MON810 tenga algún efecto adverso sobre el ambiente en el contexto de su uso como cultivo.

Así mismo se realizó un estudio de flujo de polen en el que se determinó la distancia a la cual se dispersa el polen de maíz amarillo en un lote de maíz blanco; el estudio fue llevado a cabo para dar respuesta a la preocupación de las autoridades mexicanas respecto a la posibilidad de introgresión de transgenes en maíces convencionales. Los lineamientos del protocolo así como los resultados de este estudio se encuentran en el Anexo I de éste reporte.

Adicionalmente en se realizo un estudio de posibles afectaciones a organismos no blanco (NTO) en el cual no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de insectos benéficos entre el maíz GM MON810 y su contraparte convencional. Los lineamientos de este protocolo así como los resultados se encuentran en el presente reporte en las secciones de Materiales y Métodos y en Resultados y Discusión.

VII. Efectos de las prácticas de uso y aprovechamiento.

En términos de la relación Beneficio-costos, durante esta etapa experimental de liberación, estos no pueden ser estimados debido a que se necesita tener un comparativo más real en cuanto a producción agrícola se refiere, por lo cual se sugiere que esta evaluación se realice en una etapa piloto. Sin embargo, se pueden observar beneficios potenciales con el uso de la tecnología los cuales se mencionan en las conclusiones y beneficios potenciales.

VIII. En su caso, referencia bibliográfica sobre los datos presentados.

EFSA. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (reference EFSA-GMO-NL-2004-02) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for food use, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds The EFSA Journal (2005) 182, 1-22

EFSA. 2007. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (reference EFSA-GMO-NL-2005-12) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 59122, for food use, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds

EFSA. 2009. Applications (EFSA-GMO-RX-MON810) for renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or containing maize MON810, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize MON810, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. The EFSA journal 1149, 1-85.

He, XY; Huang, KL; Li, X; Qin, W; Delaney, B; and Luo, YB. (2008). Comparison of grain from corn rootworm resistant transgenic DAS-59122-7 maize with non-transgenic maize grain in a 90-day feeding study in Sprague-Dawley rats. Food Chem. Toxicol. 46(6): 1994-2002.

Herman, RA; Storer, NP; Phillips, AM; Prochaska, LM; and Windels, P. (2007). Compositional assessment of event DAS-59122-7 maize using substantial equivalence. Regul. Toxicol. Pharmacol. 47(1): 37-47.

JBCH. 2004. Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for DAS-59122-7. Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment. <http://cera-gmc.org/docs/decdocs/06-201-002.pdf>

USDA. Aphis 2004. Petition for Non- Regulated status Cry34/35Ab1 Line 59122. Application for the Determination of NON- regulated status of Bt Cry34/35Ab1, Insect Resistant- Glufosinate tolerant Corn: Corn Line 59122. Pioneer Hi-Bred International Inc. , Jh. IA.

Center for environmental risk assessment. International Life Sciences Institute (ILSI). Research Foundation. <http://cera-gmc.org/docs/decdocs/02-269-007.pdf>. <http://cera-gmc.org/docs/decdocs/02-269-007.pdf>

**PERMISO B00.04.03.02.01.-3742 PARA EVALUAR EL EVENTO DAS-Ø15Ø7-1
x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 EN CHIHUAHUA**

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Reporte Final Febrero 2012

INTRODUCCIÓN

Pioneer de México recibió de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria Acuícola y Pesquera el permiso B00.04.03.02.01.-3742 para sembrar maíz genéticamente modificado DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 en etapa experimental. El permiso establece las medidas de bioseguridad y condicionantes que deben establecerse durante la liberación experimental al ambiente. Durante el desarrollo de la experimentación se evaluaron, la eficacia biológica, la equivalencia agronómica, el efecto del evento en insectos no blanco y flujo génico

Si bien se ha discutido en muchos foros sobre los posibles riesgos del cultivo de maíz genéticamente modificado en México y se ha solicitado información de sus efectos a la diversidad biológica, a la sanidad vegetal, animal y acuícola, es necesario evaluar mediante un análisis imparcial y objetivo los beneficios que podría presentar el cultivo del maíz genéticamente modificado en nuestro país.

Por lo anterior, es fundamental proceder a la experimentación de campo en donde se evalúen los beneficios potenciales de los híbridos de maíz genéticamente modificado para el medio ambiente, el agricultor y la calidad de la cosecha.

El maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 es un híbrido Pioneer™ resultante del cruce convencional de las líneas de maíz DAS-Ø15Ø7-1 que produce la proteína Cry 1F que le confiere resistencia a algunos lepidópteros, la línea MON-ØØ6Ø3-6 que produce la proteína CP4 EPSPS que le confiere tolerancia a herbicidas con el ingrediente activo glifosato y la línea MON-ØØ81Ø-6 que produce la proteína Cry1Ab y PAT que le confieren resistencia a algunos lepidópteros al Glifosato, respectivamente. Los genes que codifican para las proteínas Cry 1F y Cry 1A b fueron aisladas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt); el gen para fosfinotricina

acetiltransferasa (*pat*) fue aislado de *Streptomyces viridochromagenes*, y el que produce la proteína CP4 EPSPS se aisló de *Agrobacterium* cepa CP4. Estos genes fueron incorporados al maíz con la tecnología DAS-1507-1xMON-ØØ81Ø-6 xMON-ØØ6Ø3-6 utilizando técnicas de DNA recombinante.

La proteína Cry1Ab y Cry1F contenida en los materiales genéticamente modificados, debe ser ingerida por el insecto para tener un efecto insecticida y en su forma cristalina es insoluble en solución acuosa a pH neutro o ácido (Huber and Luthy, 1981; Bulla *et al.*, 1977); sin embargo, el pH del intestino de los insectos es alcalino lo cual favorece la solubilización del cristal proteínico. La proteína solubilizada es subsecuentemente activada por las proteasas del intestino del insecto, se distribuye a través de la membrana peritrófica al epitelio del intestino medio y se une a receptores altamente específicos (Wolfersberger *et al.*, 1986; Hofmann *et al.*, 1988). El intestino se paraliza como consecuencia de los cambios en los electrolitos y el pH causando que la larva del insecto pare de alimentarse y muera. Los resultados hasta ahora observados en experimentos establecidos en otros países no han demostrado efectos adversos para la diversidad biológica y el medio ambiente en el desarrollo del maíz DAS-1507-1xMON-ØØ81Ø-6 xMON-ØØ6Ø3-6. Las proteínas Cry1Ab Cry1F son específicas para lepidópteros, y son consideradas inocuas para mamíferos, pájaros e insectos no-blancos, ya que esta proteína no se solubiliza y no se disuelven en los intestinos ácidos de insectos depredadores (Castillejos, *et al.*, 2000). La proteína CP4 EPSPS y PAT que producen los maíces híbridos con esta tecnología, presenta afinidad reducida al Glifosato cuando se compara con la enzima nativa del maíz.

Los objetivos de esta investigación en la etapa de experimentación, fueron: a) Evaluar la Eficacia Biológica del evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 frente al ataque de insectos lepidópteros, en híbridos adaptados a las condiciones de Cuauhtémoc, Chihuahua, b) Evaluar el efecto de la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 en insectos no blanco, c) Generar datos e información que nos permita estimar si la modificación genética del evento ha alterado la equivalencia agronómica, en comparación con su control no modificado (Isohíbrido) y d) Determinar la distancia a la cual se dispersa el polen de maíz amarillo en un lote de maíz blanco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y características de las parcela.

El presente experimento se llevo a cabo en los Municipios de Cuauhtémoc en la localidad de las Pampas del Estado de Chihuahua

Los lotes seleccionados para los experimentos se encontraban aislados a una distancia de al menos 600 m de otros lotes en los que se sembraba el mismo cultivo para evitar cualquier tipo de contaminación en ambos sentidos; así mismo, las fechas de siembra se seleccionaron para evitar coincidencia en la polinización del maíz transgénico con el de la región. El área experimental que ocupó un total de 1400 m² fue rodeada con la siembra simultánea de 4 surcos con el maíz híbrido de referencia y delimitada por una cerca electrificada de 4 hilos que se mantuvo bajo vigilancia durante las 24 horas del día, hasta la conclusión de las evaluaciones.

El manejo agronómico del cultivo durante el desarrollo del experimento se hizo en base a las prácticas agronómicas de la región norte del estado de Chihuahua.

Material Genético

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizaron los híbridos de maíz genéticamente modificado DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y su Isohíbrido.

Diseño Experimental.

El diseño experimental para evaluar la eficacia biológica del evento y la equivalencia agronómica fue de parcelas divididas en bloques al azar con 4 repeticiones para cada tratamiento. La parcela grande consistió de 2 tratamientos; infestación natural y control insecticida. (Figura 1).

Para evaluar el efecto del evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 en los insectos no blanco se sembraron 16 surcos de 5 m de largo de este material, junto con otros dos eventos y el híbrido de referencia. En cada parcela se colocó una trampa amarilla pegajosa y una trampa *pitfall* (Figura 1).

La parcela chica consistió de tres híbridos sembrados uno al lado del otro, en diez surcos; dos surcos del híbrido de referencia, cuatro del isohíbrido y cuatro del material genéticamente modificado DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6. La parcela útil fueron los dos surcos centrales de cada material evaluado excepto el de referencia que solo se uso como bordo entre las parcelas. Los surcos de cada parcela chica tenían una longitud de 5 m de largo y a una distancia entre surco de 0.8 m. La superficie de la parcela chica fue de 40.0 m² y la del experimento 713 m², incluyendo calles y bordos (cuatro surcos); cada surco fue ajustado a 30 plantas para evitar diferencias en tratamientos y repeticiones.

Tratamientos

Los tratamientos evaluados en el presente experimento fueron:

Parcelas grandes:

1. Control insecticida
2. Infestación natural

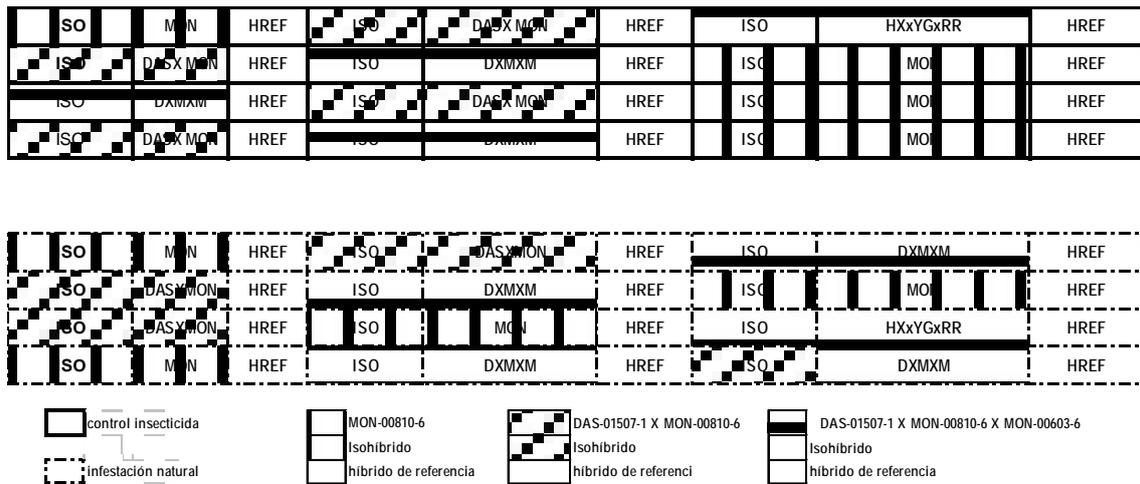
Parcelas chicas (apareadas)

1. Isohíbrido
2. Híbrido DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6
3. Híbrido de referencia. (No se utilizara para el análisis estadístico)

El tratamiento insecticida se aplicó 34 y 44 días después de la siembra, asegurando que la presión de la plaga en la parcela experimental fuera suficiente para evaluar la eficacia biológica del maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 (Figura 1).

Para evaluar el efecto del evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 en los insectos no blanco se sembraron 16 surcos de 5 m de largo de este material, junto con otros dos eventos y el híbrido de referencia. En cada parcela se colocó una trampa amarilla pegajosa y una trampa *pit fall* (Figura 1).

CROQUIS DE EFICACIA Y EQUIVALENCIA AGRONÓMICA



CROQUIS DE INSECTOS NO BLANCO

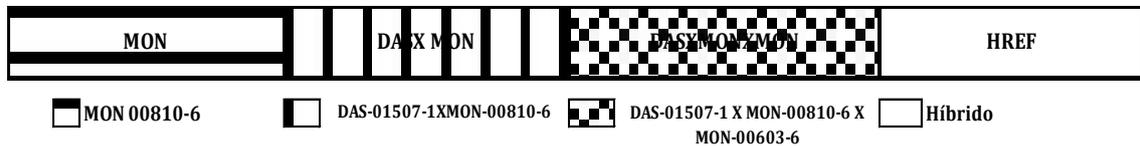


Figura 1 Diseño experimental de siembra para evaluar el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6.

Variables evaluadas.

Eficacia biológica.

- Porcentaje de plantas con daño foliar
- Porcentaje de tallos dañados por Gusano Barrenador del Tallo
- Extensión de la galería en tallos

1. Daño foliar por Gusano Cogollero (*Spodoptera frugiperda*). En las etapas vegetativas, V2-V4, V6-V8 y V10 (hojas por planta), se evaluaron 10 plantas de los surcos centrales de DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y 10 de su Isohíbrido en cada una de las parcelas. El daño se midió usando la escala de Davis (Davis, *et al.*, 1989; Guthrie, *et al.*, 1960; Mihm, J.A. 1983a, b) (Tabla 1), donde 1 indica altamente resistente y 9 susceptible. También se calculó el número promedio de plantas con daño de cogollero y el porcentaje. El promedio del valor Davis y el porcentaje se calcularon utilizando las evaluaciones de las tres etapas de desarrollo (Etapa V2-V4, V6-V8 y V10).

Tabla 1. Descripción de la escala de Davis, usada para evaluar el daño causado por el Gusano Cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*¹

Nivel de Resistencia	Escore	Descripción
Altamente Resistente	1	Sin daño- algunas perforaciones en forma de piquetes de alfiler
Resistente	2	Perforaciones en forma de bala en pocas hojas
	3	Perforaciones en forma de bala en algunas hojas.
Resistencia Intermedia	4	Perforaciones en forma de bala en algunas hojas, pocas lesiones alargadas.
	5	Varias hojas con lesiones alargadas.
	6	Varias hojas con lesiones alargadas menores de 2.5 cm.
	7	Lesiones alargadas comunes en la mitad de las hojas
Susceptible	8	Lesiones alargadas comunes en $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ de las hojas.
	9	La mayoría de las hojas con lesiones alargadas.

¹Davis et al. (1989, 1992), Guthrie et al (1960, 1978) and Mihm (1983^{a,b})

- 2. Daño por Gusano Barrenador del Tallo (*Diatraea spp*).** El día anterior a la cosecha se evaluaron 10 plantas de los surcos laterales de DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y 10 de su Isohíbrido en cada una de las parcelas. El tallo de cada planta se cortó longitudinalmente y se determinó si existía daño por Gusano Barrenador del Tallo y, en su caso la longitud de la galería en cm (Rodríguez del Boque, L. A. 1996).
- 3. Daño por Gusano Elotero (*Helicoverpa zea*)** En la cosecha, se evaluaron 10 mazorcas de los surcos centrales de DAS-Ø15Ø7-1 y 10 de su Isohíbrido en cada una de las parcelas. Se midió la extensión de las galerías causadas por el Gusano Elotero en centímetros, con la ayuda de un vernier.

Organismos No Blanco

En la parcela experimental de 32 surcos de 5m de largo, en la que se sembró maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y su isohíbrido se cuantificó el número y clase de artrópodos no blanco en las

trampas amarillas pegajosas y en las trampas pitfall; En estas parcelas también se colectaron insectos con una red entomológica, para lo cual se recorrió la parcela dando 50 redazos (ida y vuelta) sobre el follaje del Isohíbrido y otros 50 redazos (ida y vuelta) en las parcelas sembradas con el evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6. Los insectos capturados con los tres tipos de muestreo se cuantificaron y clasificaron para determinar si el evento tenía algún efecto sobre las poblaciones de insectos no blanco.

Equivalencia Agronómica.

La equivalencia agronómica se evaluará en la parcela con control de insecticida

1. Vigor de plántula (VP). Cuando el maíz alcanza en promedio la etapa de desarrollo V1-V2, se determinó el valor del vigor de las plántulas. Una escala del 1-9 fue utilizada en la que, 1 es el valor más bajo y 9 el valor más alto. Estos datos se determinaron antes del raleo manual y/o la primera labor de cultivo
2. Emergencia (EM). Cuando el maíz alcanzó la etapa de desarrollo promedio de V2-V4, se determinó la cantidad de plántulas emergidas por parcela. Este número se determinó antes del raleo y la primera labor de cultivo.
3. Días a floración masculina y femenina (DFM/DFF). Se determinó la fecha en que el 50% de las plantas de la parcela presentaron estigmas de 2 cm de largo y la fecha en que el 50% de las espigas de las plantas se encontraban liberando polen.
4. Stay green (SG). El staygreen se determinó cuando el 50% de las plantas alcanzaron la etapa de desarrollo R6 (madurez fisiológica). Una escala del 1-9 se utilizó, en donde, 1 es el valor más bajo y 9 es el valor más alto.
5. Altura de mazorca (AM). La altura de mazorca se determinó desde la superficie del suelo a la base del nudo donde se encuentra unida la mazorca. Se cuantificó cuando el 50% de las plantas alcanzaron la etapa de desarrollo R2, cuantificando la altura de la mazorca en 5 plantas representativas de cada parcela.
6. Altura de planta (AP). La altura de las plantas se determinó desde la superficie del surco hasta la lígula de la hoja bandera. Se cuantificó cuando el 50% de las

plantas alcanzaron la etapa de desarrollo R2, cuantificando la altura de 5 plantas representativas de cada parcela.

- 7.** Mazorcas caídas (MC). Previo a la cosecha se cuantificó el número de mazorcas caídas por parcela. Las mazorcas caídas fueron aquellas que se encontraron en el suelo completamente desprendidas de la planta.
- 8.** Acame de tallo (AT). Previo a la cosecha se cuantificó el número de plantas por parcela quebradas por debajo de la mazorca. Los tallos quebrados por arriba de la mazorca principal no se incluyeron dentro de estos datos.
- 9.** Acame de raíz (AR). Un día antes de la cosecha, se cuantificó el número de plantas con acame de raíz por parcela (excluyendo tallos quebrados). Se consideraron plantas con acame de raíz aquellas que presentaban una inclinación mayor de 30^0 respecto de la vertical
- 10.** Cuento final de plantas (CF). Previo a la cosecha se determinó el número de plantas por parcela, incluyendo las plantas con acame de raíz o tallo.
- 11.** Peso de la parcela. La cosecha se realizó los días 11 - 14 de julio del 2011; la actividad se realizó de forma manual. Las mazorcas de cada material y parcela se contaron y desgranaron en una desgranadora marca Azteca Modelo 1.5 con un motor de 5.5 hp, el grano fue pesado en una balanza granataria Modelo ECO-B-30.
- 12.** Humedad del grano. la humedad del grano por parcela y material, se determinó con un medidor marca John Deere SW 08120.
- 13.** Pudrición del tallo. El día de la cosecha se evaluaron 10 plantas de los surcos laterales de DAS-Ø15Ø7-1 y 5 de su Isohíbrido en cada una de las parcelas. El tallo de cada planta se cortó longitudinalmente y se determinó si existía pudrición del tallo y la severidad de la misma, utilizando una escala de 1 a 9 en donde 1-2 daño severo, 3-5 daño moderado, de 6-8 ligero y 9 sin síntoma.
- 14.** Pudrición de mazorca y granos. Al momento de la cosecha se determinó el grado de pudrición de la mazorca, utilizando una escala 1-9, en donde 9 significa ningún síntoma, 6-8, síntomas ligeros; 3-5 moderado y 1-2, severo.

- 15.** Escala de llenado de mazorca. Este parámetro se llevó a cabo previo a la cosecha, de la uniformidad de la mazorca en el llenado de grano y se realizó en 5 mazorcas de cada surco, utilizando una escala de 1 a 5 donde 1 es muy deficiente y 5 es óptimo.
- 16.** Numero de mazorcas cosechadas. La cosecha se llevó a cabo en los dos surcos centrales y de forma manual, posteriormente se contabilizo el número de mazorcas de cada material y se colocaron etiquetado.
- 17.** Rendimiento. Se evaluó el porcentaje de humedad del grano y el peso del grano como se describe en el numeral 11 y 12. El rendimiento por parcela se calculo por medio de la siguiente fórmula: $\text{Rendimiento (ton/ha)} = (((100-\% \text{Hum})/86) \times \text{Peso de Campo})/L \times W \times N \times 0.1$; donde:
- Rendimiento = Rendimiento de grano Total ajustado a Ton/ha al 14% de humedad
 - (%) Hum = Porcentaje de humedad en la muestra de grano
 - Peso de Campo = Rendimiento de grano Total (kg por parcela)
 - L = Longitud de la parcela en metros
 - W = Distancia entre surcos en metros
 - N = Número de surcos por parcela.

Cosecha

La cosecha terminó el día 1º de Diciembre del 2011, la actividad se realizo de forma manual. Las mazorcas de cada material y parcela se contaron y desgranaron en una desgranadora marca Azteca Modelo 1.5 con un motor de 5.5 hp, el grano fue pesado en una balanza granataria Modelo ECO-B-30, la humedad del grano por parcela y material, se determinó con un medidor marca John Deere SW 08120.

Posterior a la cosecha todo el grano y residuos vegetales fueron destruidos con un molino y todo el material resultante fue incorporado al suelo por medio de una rastra.

Postcosecha

Durante 30 días posteriores a la finalización del experimento, el lote fue inspeccionado para la detección de plantas voluntarias las cuales fueron arrancadas y destruidas manualmente.

Análisis estadístico

Los datos registrados de cada una de las variables se analizaron estadísticamente con el paquete SAS (2004) para un diseño experimental de parcelas divididas con parcela chica apareadas, realizándose después una comparación de medias por medio de la Prueba de Tukey ($P > 0.01$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficacia biológica.

Daño por Gusano Cogollero (*Spodoptera frugiperda*)

El evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 fue resistente al ataque de la plaga al presentar valores de 1.03 y 1.00 en la escala de Davis que fueron diferentes significativamente cuando se compararon con el Isohíbrido que presentaron galerías con un promedio de 3.09 y 1.91 en las parcelas con y sin aplicación de insecticida, respectivamente. (Figura 2). La aplicación de insecticidas redujo el daño por Gusano Cogollero pero esta reducción fue estadísticamente significativa solo en el Isohíbrido, en donde el índice de daño se redujo de 3.09 a 1.91 en las parcelas con y sin control de insecticida (Figura 2).

- 1. Porcentaje de daño por Gusano Cogollero.** Cuando se compara el porcentaje de plantas con daño por Gusano Cogollero la diferencia significativamente entre el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y su Isohíbrido es más notoria. Las parcelas de maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 presentaron un porcentaje de plantas con daño significativamente menor al registrado para su Isohíbrido (Figura 3). El daño en maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 fue de 2.8 y 0% para los tratamientos infestación natural y con control insecticida, respectivamente; mientras que en el Isohíbrido fue de 58.7 y 50.0% para los

tratamientos infestación natural y con control insecticida, respectivamente (Figura 3).

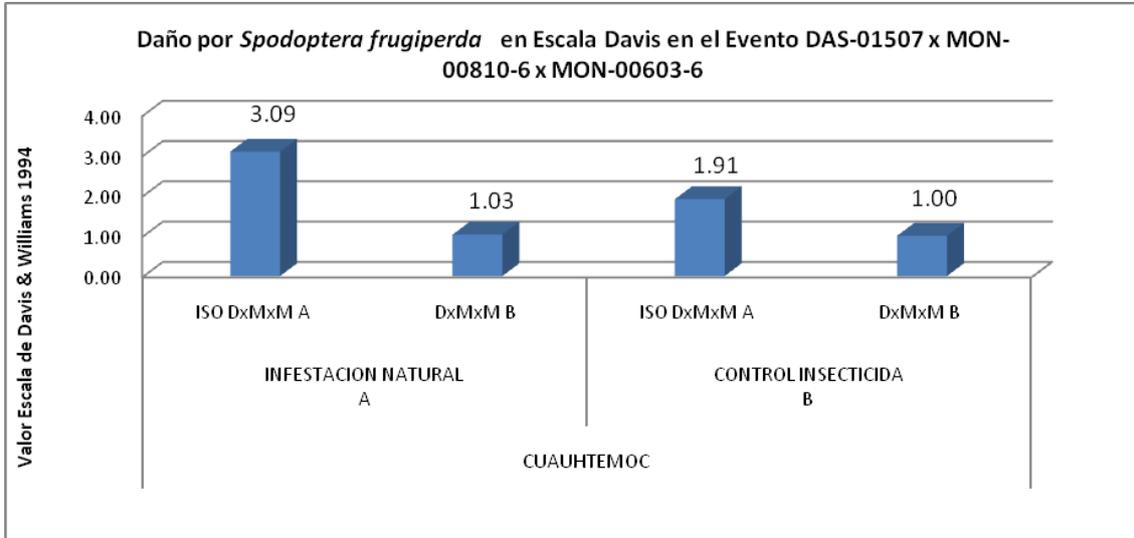


Figura 2. Daño por Gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* expresado en la escala de Davis en parcelas sembradas con maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y su Isohíbrido (ISO DASXMONXMON) en Cuauhtemoc, Chihuahua, ciclo primavera 2011. Tratamientos seguidos por la misma letra, en el eje horizontal no difieren significativamente (Tukey 0.05).

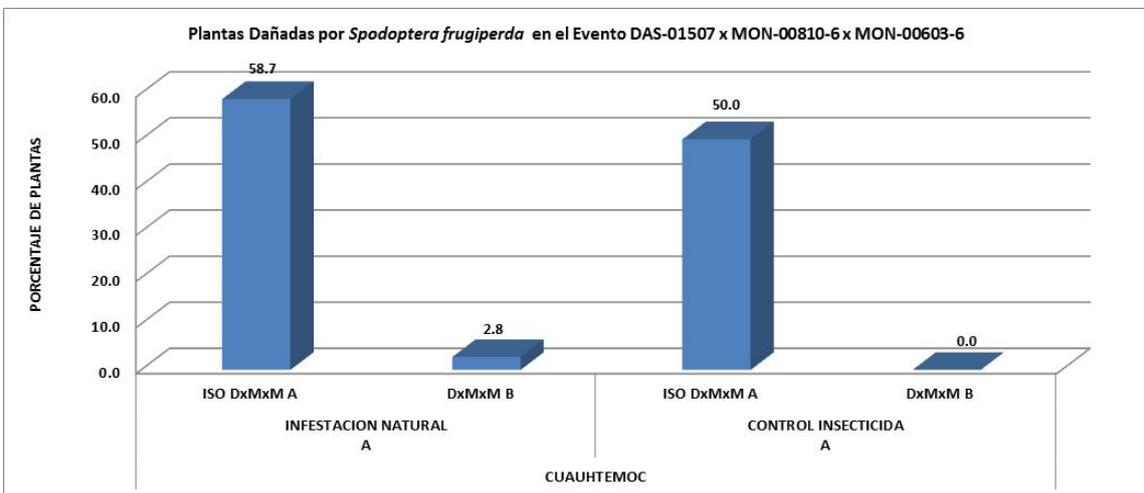


Figura 3. Eficacia Biologica expresada en porcentaje de plantas dañadas por el Gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* en el evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y su Isohíbrido en Cuauhtémoc, Chihuahua 2011. Tratamientos seguidos por la misma letra, en el eje horizontal no difieren significativamente (Tukey 0.05).

2. Evolución del daño por Gusano Cogollero. Al graficar el daño por cogollero durante las etapas de desarrollo del maíz, se observó claramente la diferencia entre el maíz con la tecnología MON-ØØ81Ø-6 y su isohíbrido en Cuauhtémoc, Chihuahua (Figura 4). La aplicación de insecticida en V2-V4 se reflejó en un menor incremento del daño por Gusano Cogollero en el Isohíbrido, que repuntó después de la etapa V6-V8. En el caso del maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 el porcentaje de daño se mantuvo en niveles mínimos.

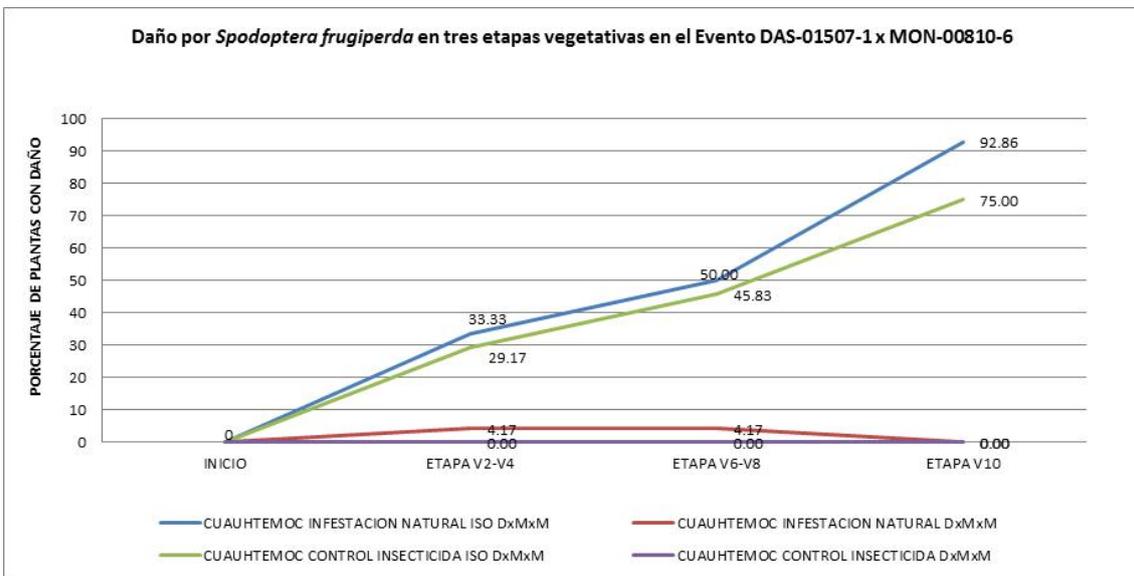


Figura 4. Desarrollo del daño causado por el Gusano Cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en parcelas sembradas con maíz DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 (DxMxM) y su Isohíbrido en Cuauhtemec, Chihuahua, 2011.



Isohíbrido



DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6

Daño por Gusano Barrenador del Tallo (*Diatraea spp.*)

La incidencia de daño por barrenador del tallo fue de cero, por lo que no fue posible evaluar la eficacia biológica en el Evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 contra esta plaga lepidóptera.

Daño por Gusano Elotero (*Helicoverpa zea*)

No se observaron diferencias significativas en el tamaño de las galerías causadas por *H. zea* entre los maíces con el evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 y su Isohíbrido. La falta de diferencias significativas entre el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 pudo deberse a la baja concentración de la proteína Cry1F en el grano (71-114 ng/mg de proteína) que, aunque tiene un cierto grado de supresión se requiere que la plaga ingiera cantidades considerables de semilla para intoxicarse. En las hojas, la proteína Cry1F alcanza concentraciones de 56-148 mg/kg de tejido fresco (Clark et al., 2005 citado por Ibarra et al 2011), lo que causa un efecto tóxico en las larvas de Gusano Cogollero o Elotero, aún cuando la cantidad de tejido ingerido sea pequeña (Figura 2 y Figura 3).

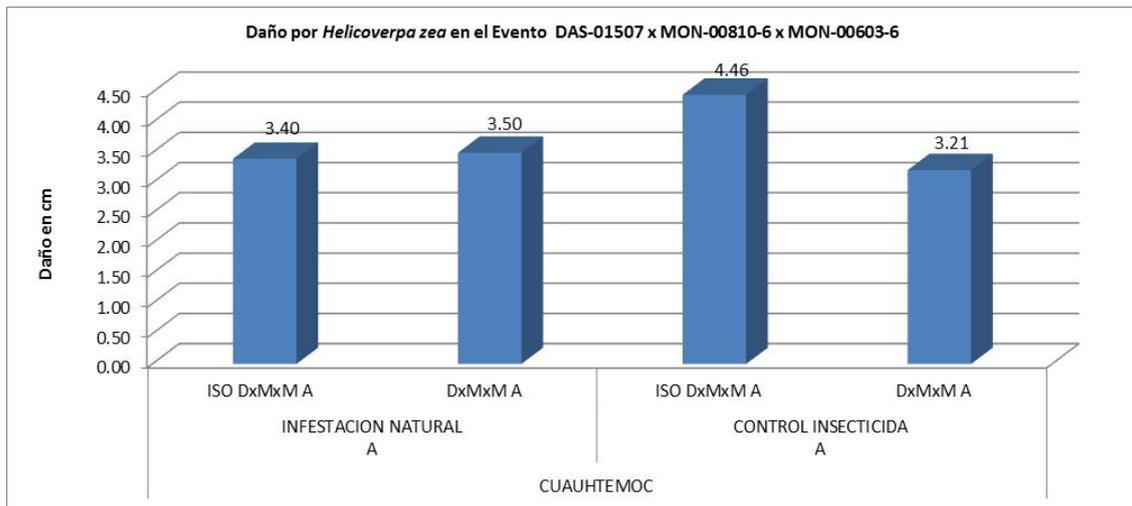


Figura 6. Eficacia Biológica expresada en longitud de galerías causadas por el Gusano Elotero *Helicoverpa zea* en el evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6 en Cuauhtemo, Chihuahua 2011. Tratamientos seguidos por la misma letra, en el eje horizontal no difieren significativamente (Tukey 0.05).

Daño por Gusano Elotero (*H. zea*) en la mazorca.

Organismos no Blanco

El número de familias de insectos capturados en las parcelas sembradas con maíz DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 y su isohíbrido fueron similares, 24 y 22 familias, por trampa respectivamente. A continuación se presenta el listado de artrópodos benéficos (parasitoides, depredadores y polinizadores) capturados con los diferentes tipos de muestreo trampas *pitfall*, amarillas y red entomológica (Tabla 2). Los órdenes de insectos capturados fueron; Aranae, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, y Neuroptera como se muestra en el Tabla 3.

Tabla 2. Presencia o ausencia de artrópodos benéficos capturados en Cuauhtémoc, Chihuahua durante el ciclo Primavera/Verano 2011.

Orden	Familia	Grupo Funcional	DAS-01507-1x MON-00810-6x MON-00603-6	Isohíbrido
Aranae		Depredador	*	*
Coleoptera	Staphylinidae	Depredador	*	*
Coleoptera	Coccinellidae	Depredador	*	*
Coleoptera	Cantharidae	Depredador		*
Diptera	Tchinidae	Depredador	*	
Diptera	Phoridae	Parasitoide	*	*
Diptera	Asilidae	Depredador	*	*
Hemiptera	Anthocoridae	Depredador	*	*
Hemiptera	Geocorixydae	Depredador	*	*
Hemiptera	Myridae	Depredador		*

Hemiptera	Pentatomidae	Depredador	*	*
Hymenoptera	Apidae	Polinizador	*	*
Hymenoptera	Bethyloidea	Parasitoide	*	
Hymenoptera	Brachonidae	Parasitoide	*	*
Hymenoptera	Cynipidae	Parasitoide		*
Hymenoptera	Encyrtidae	Parasitoide	*	
Hymenoptera	Eulophidae	Parasitoide	*	
Hymenoptera	Eupelmidae	Parasitoide	*	
Hymenoptera	Eurytomidae	Parasitoide	*	*
Hymenoptera	Formicidae	Depredador	*	*
Hymenoptera	Halictidae	Parasitoide	*	*
Hymenoptera	Ichneumonidae	Parasitoide	*	*
Hymenoptera	Megaspilidae	Parasitoide	*	*
Hymenoptera	Mymaridae	Parasitoide	*	*
Hymenoptera	Pteromalidae	Parasitoide	*	*
Hymenoptera	Perilampidae	Parasitoide	*	
Hymenoptera	Alictidae	Parasitoide		*
Neuroptera	Crysopidae	Depredador	*	*
Número de Familias			24	22

El número promedio de insectos por semana en las parcelas de maíz DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 fue similar al de las parcelas con de isohíbrido de referencia en los tres tipos de muestreo utilizados Figura 7. En la mayoría de los casos el número de insectos benéficos fue mayor en el maíz DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6, a excepción del muestreo con red entomológica en donde el isohíbrido presentó mayor numero de insectos no blanco, comparado con el colectado en las parcelas con maíz DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6; sin embargo, ésta diferencia (3 insectos) no indica un efecto negativo del evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 sobre las poblaciones insectos benéficos (Figura 7).

Al observar la captura de insectos benéficos por categoría tampoco se encontraron diferencias importantes entre el número de insectos polinizadores, depredadores y parasitoides capturados con diferentes tipos de muestreo (Figura 8). Esto corrobora que no existe un efecto negativo del evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 sobre la diversidad ni en la densidad de población de insectos no blanco.

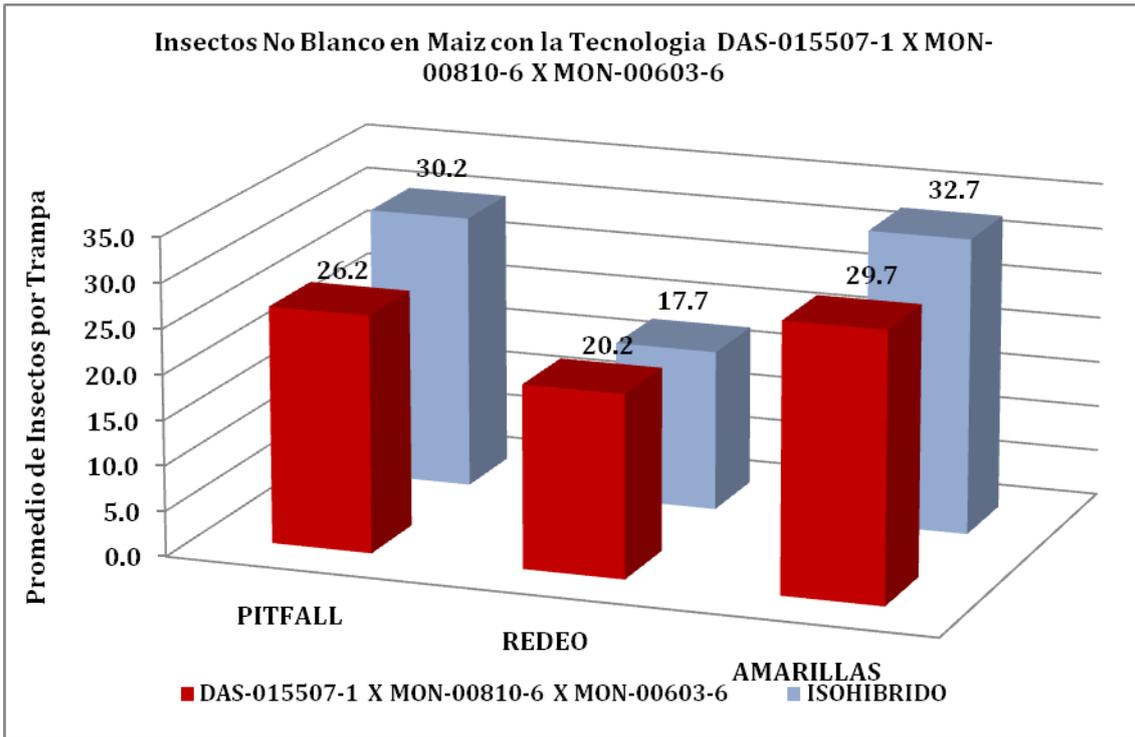


Figura 7. Promedio de insectos benéficos capturados en tres tipos de muestreo en maíz con el evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 en Cuauhtémoc, Chihuahua, ciclo Primavera/Verano 2011.

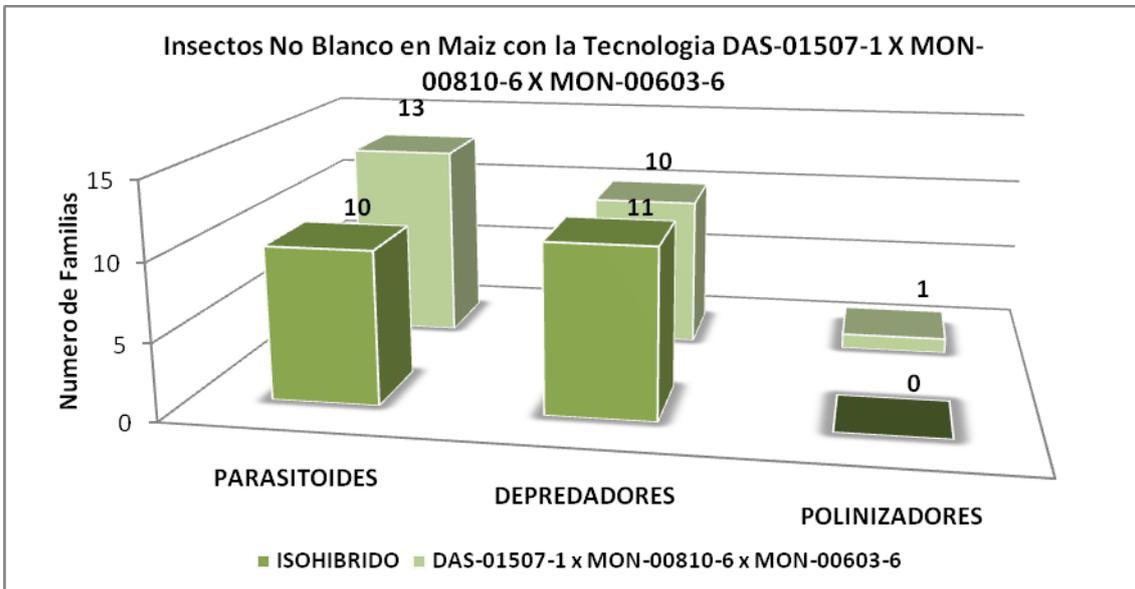


Figura 8. Número de familias por grupo funcional capturadas en maíz con el evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 y su isohíbrido en Cuauhtémoc Chihuahua, ciclo Primavera/Verano 2011.



Trampas amarillas en el experimento de Organismos No Blanco.

Rendimiento.

Las parcelas sembradas con el híbrido de maíz DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 presentaron un rendimiento significativamente mayor que su isohíbrido en ambos tratamientos, infestación natural y con insecticida. El rendimiento del maíz con el evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 presentó rendimientos de 20.55 y 18.59 ton/ha para los tratamientos con insecticida e infestación natural, respectivamente. El maíz isohíbrido presentó rendimientos de 16.69 y 16.28 ton/ha (Figura 9), para los tratamientos con insecticida e infestación natural, respectivamente.

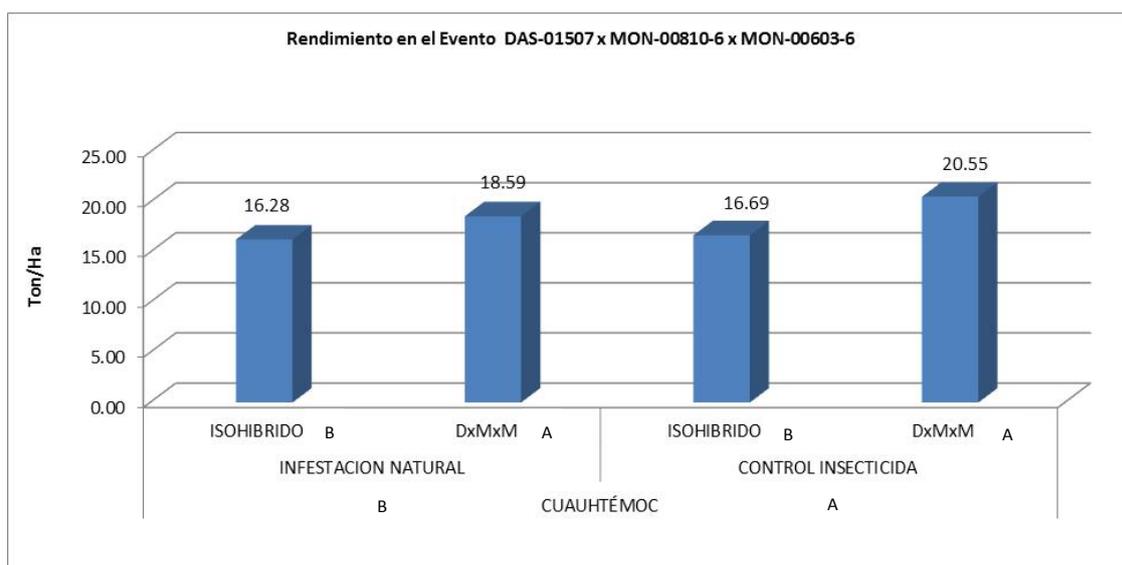


Figura 9. Rendimiento de maíz en ton/ha para maíz con el evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 (DxMxM) y su isohíbrido en Cuauhtémoc, Chihuahua, ciclo Primavera/Verano 2011. Tratamientos seguidos por la misma letra, en el eje horizontal no difieren significativamente (Tukey 0.05).

Equivalencia Agronómica

Se tomaron en consideración 16 características fenotípicas y fisiológicas del cultivo para estimar si la modificación genética del evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 afectó significativamente la equivalencia agronómica en comparación con su isohíbrido.

El maíz con el evento DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 se comportó de manera equivalente a su isohíbrido en 12 de los 16 parámetros evaluados, tal y como lo refleja la ausencia de diferencias significativas entre ambos materiales (Tabla 3). Las diferencias en Rendimiento (R) y Altura de Mazorca (AM) entre el maíz DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 y su isohíbrido pueden deberse a la eficacia de la tecnología DAS-01507 x MON-00810-6 x MON-00603-6 sobre las plagas blanco y no a un efecto del evento sobre el parámetro en cuestión. Adicionalmente, la Emergencia (Em) y el *Staygreen* (SG) fueron dos parámetros que no equivalentes; las diferencias en Emergencia pueden atribuirse a la calidad del lote de semilla empleada, razón por la cual el protocolo establece que debe hacerse un aclareo a 30 plantas por surco para evitar que esto afecte la evaluación de otras características. La

diferencia en humedad del suelo, producto de la inclinación de la parcela experimental, pudo influir en los resultados del parámetro *Staygreen*.

Tabla 3. Equivalencia agronómica del maíz DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6 y su isohíbrido en Cuauhtémoc, Chihuahua.

Cuauhtémoc			
Parámetro	Isohíbrido	DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6	Tukey
PT	8.98	8.8	NS
PM	8.53	8.43	NS
LL_M	5	5	NS
NM	73.2	82.5	NS
PG	14.9	17.9	*
HG	26.7	25.12	NS
VP	-	-	-
Em	26.8	55.7	*
DFM	68	68	NS
DFF	66	66	NS
SG	8	7	*
AM	111.5	124	*
AP	243.6	251.4	NS
MC	0	0	NS
AT	0.25	0.68	NS
AR	0	0	NS
CF	26.9	31.8	*

PT.-Putridión del tallo; PM.-Putridión de la mazorca; LL_M.-Llenado de mazorca; NM.- Número de mazorcas cosechadas; PG.- Peso de grano.- HG.- Humedad del grano; VP.- Vigor de planta; Em.- Emergencia; DFM.- Días a floración masculina; DFF.- Días a floración femenina; SG.- Staygreen; AM.- Altura de mazorca; AP.- Altura de planta; MC.- Mazorcas caídas; AT.- Acame de tallo; AR.-Acame de raíz; CF.-Cuento final.

N/S Diferencias no significativas

***Diferencias significativas**

En forma general después de analizar las 16 características agronómicas, incluyendo parámetros de Vigor de Emergencia, Desarrollo Vegetativo, Madurez, Características Fenotípicas, así como parámetros de rendimiento, se puede concluir que no hay una diferencia sustancial y/o funcional entre el maíz con el evento DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6 en relación a su isohíbrido.

CONCLUSIONES

Eficacia Biológica

1. El maíz genéticamente modificado con el evento DAS-01507-1 x MON-00810-6 X MON-00603-6 fue resistente al ataque de Gusano Cogollero (*Spodoptera frugiperda*), en la localidad de Cuauhtémoc, Chihuahua.
2. El rendimiento de maíz con el evento DAS-01507-1 X MON-00810-6 x MON-00603-6 fue significativamente mayor que el de su isohíbrido bajo las condiciones evaluadas.

Organismos No Blanco

1. El evento con la tecnología DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6, no mostró efecto negativo sobre la diversidad ni la densidad de poblaciones de insectos no blanco.

Equivalencia Agronómica

1. El maíz GM que contiene el evento DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6 fue agronómicamente equivalente a su isohíbrido, en la localidad de Cuauhtémoc, Chihuahua.

BENEFICIOS POTENCIALES

1. Reducción del número de aplicaciones de insecticida; para el control de algunas plagas de insectos lepidópteros. Para este tipo de plagas el productor de la región regularmente realiza dos aplicaciones de insecticida, mismas que usando la tecnología DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6 podrían disminuir o no ser requerirían. Esto representa una reducción en los costos de producción.
2. El uso de la tecnología DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6 es amigable con el medio ambiente, ya que la tecnología reduce la necesidad de aplicar insecticidas para el control de algunos lepidópteros y por lo tanto disminuye la contaminación química del suelo, el agua así como del producto (maíz).

3. La tecnología DAS-01507-1 x MON-00810-6 es amigable con la agroecología pues, al reducir el uso de pesticidas, se protege la entomofauna benéfica fomentando el equilibrio ecológico de insectos parasitoides, depredadores, polinizadores así como de insectos plaga.
4. La tecnología MON-00810-6 tiene el potencial de reducir las poblaciones de otras plagas de Lepidópteros, como el Gusano Soldado (*Spodoptera exigua*).
5. El evento DAS-01507-1 x MON-00810-6 x MON-00603-6 tiene el potencial de combinar los modos de acción de de 2 proteínas Cry, Cry1F y Cry1Ab, lo que puede mejorar el efecto sobre las plagas blanco.

LITERATURA CITADA

Bulla, L. A., Jr., K. J. Kramer, and L. I. Davidson. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **130**:375-383.

Huber, H. E. and Luthy, P. 1981. *Bacillus thuringiensis* (5-endotoxin: composition and activation. In *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases* (ed. E. W. Davidson), pp. 209-234. Allanheld: Osmun., Totowa, NJ.

Hofmann, C, Luethy, P., Huetter, R. and Pliska, V. (1988). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**, 85-91.

Wolfersberger, M. G., Hofmann, C. and Luethy, P. (1986). Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. *Zentralbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. I. (Suppl.)* **15**, 237-238.

Davis, F.M., Sen, S.N. & Williams, W.P. 1989. Mechanisms of resistance in corn to leaf feeding by southwestern corn borer and European corn borer (Lipidoptera: *Phyralidae*). *J. Econ. Entomol.*, 82: 919-922.

Davis, F.M., Williams, W.P. & Wiseman, B.R. 1989. Methods used in screening and determining mechanisms of resistance to the southwestern corn borer and fall armyworm. In *CIMMYT 1989. Towards Insect Resistance Maize for the Third World: Proc. Int. Symp. on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects*. Mexico, DF, CIMMYT.

Guthrie, W.D., Dicke, F.F. & Neiswander, D.R. 1960. Leaf and sheath feeding resistance to the European corn borer in eight inbred lines of dent corn. Ohio Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 860.

Mihm, J.A. 1983a. Efficient mass rearing and infestation techniques to screen for host plant resistance to maize stem borers (*Diatraea spp.*). Mexico, DF, CIMMYT. 16 pp.

Mihm, J.A. 1983b. Techniques for efficient mass rearing and infestation in screening for host plant resistance to corn earworm, *Heliothis zea*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT, El Batán, México. 16 pp.

Castillejos Vasty, García Luis, Cisneros Juan, Goulson Dave, D. Cave Ronald, Primitivo Caballero & Williams Trevor. 2000. The potential of *Chrysoperla rufilabris* and *Doru taeniatum* as agents for dispersal of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus in maize. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 353–359.

García, M., C. Watson y F. Salcedo. 2001. Evaluación de métodos para determinar resistencia al acame de raíces en maíz dulce (*Zea mays* L.). *Bioagro* 13 (1) 22-31.

Iannone, N. 2001. Control químico de *Diatraea* tecnología que apunta a la alta producción. Revista de tecnología agropecuaria. Divulgación técnica del INTA Pergamino. Vol. VI. Nro. 17. pp.33-37. *Diatraea saccharalis*

Aragón, J. 2002. Plagas de maíz y su control integrado. En: Guía Dekalb del cultivo de Maíz. E. Satorre et al. (Eds.). p 117-134. Monsanto Argentina S.A. Bs. As., Argentina. *Diatraea saccharalis*