PHI MÉXICO SA DE CV

DOW AGROSCIENCES DE MEXICO SA DE CV

INFORMACIÓN NO CONFIDENCIAL

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

DAS-Ø15Ø7-1

Solicitud 114_2010

Para la localidad de San Pedro de las Colonias
en la región de la Laguna

Para la Protección Contra Algunos Insectos Lepidópteros

Febrero de 2012

PHI México SA de CV
Carr. GDL-Morelia Km 21 No. 8601-B
Poblado de Nicolás R. Casillas
Tlajomulco de Zuñiga, Jal.

Dow AgroSciences de México SA de CV
Ave. Patria 2085, Piso 4
Fracc. Puerta de Hierro
Zapopan, Jal

TABLA DE CONTENIDO

REPORTE DE RESULTADOS CONFORME A LO DISPUESTO EN EL ARTÍCULO 18 DEL REGLAMENTO DE LA LEY DE BIOSEGURIDAD DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS REFERENTE AL PERMISO DE DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE DE LA SOLICITUD 114_2010 PARA EL EVENTO DAS-Ø15Ø7-1 EN LA REGIÓN DE LA LAGUNA 3

I. Lineamientos del protocolo propuesto para la liberación experimental o en programa piloto 3

II. Cambios fenotípicos del OGM respecto a su adaptación al área de liberación 3

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 5

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 7

VI. Posibles efectos al ambiente y a la diversidad biológica por la liberación del OGM, incluyendo, el protocolo utilizado para establecer estos posibles efectos 8

VII. Efectos de las prácticas de uso y aprovechamiento 9

VIII. En su caso, referencia bibliográfica sobre los datos presentados. 10

REPORTE DEL PERMISO B00.04.03.02.01.-4867 PARA EVALUAR EL MAIZ CON EL EVENTO DAS-Ø15Ø7-1 EN CHIHUAHUA 12

INTRODUCCIÓN 12

MATERIALES Y METODOS 13

Localización y Característica de la Parcela 13

Material Genético 14

Diseño Experimental 14

Tratamientos 14

Variables evaluadas 16

Análisis estadístico. 20

RESULTADOS Y DISCUSION 21
Eficacia Biológica 21
Equivalencia Agronómica 26
CONCLUSIONES 29
Eficacia Biológica 29
Equivalencia Agronómica 29
REFERENCIAS 30

REPORTE DE RESULTADOS CONFORME A LO DISPUESTO EN EL ARTÍCULO 18 DEL REGLAMENTO DE LA LEY DE BIOSEGURIDAD DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS REFERENTE AL PERMISO DE DE LIBERACIÓN AL AMBIENTE DE LA SOLICITUD 114_2010 PARA EL EVENTO DAS-Ø15Ø7-1 EN LA REGIÓN DE LA LAGUNA

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

Los lineamientos de los protocolos para esta segunda fase de experimentación se encuentran a partir de la página 13 de este reporte de resultados en el siguiente orden:

- Eficacia Biológica a partir de la página 17.
- Equivalencia Agronómica a partir de la página 18.
- 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 a través del protocolo de equivalencia agronómica. No se observaron cambios estadísticamente significativos en cuanto al fenotipo al realizar la comparación entre el maíz genéticamente modificado y su contraparte convencional. Los resultados del primer ciclo de evaluación derivados de este protocolo se encuentran en la página 23 del reporte final correspondiente al permiso B00.04.03.02.01.-6031 de la solicitud 053_2009.

En este segundo ciclo de evaluación los resultados fueron ratificados al demostrarse nuevamente que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el maíz genéticamente modificado y su isohíbrido con lo que se confirma que agronómicamente son equivalentes. Los resultados de este segundo ciclo se encuentran a partir de la página 26 de este reporte.

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

El gen de selección empleado durante la transformación (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 amoniaco, lo cual provoca que el amoniaco 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.

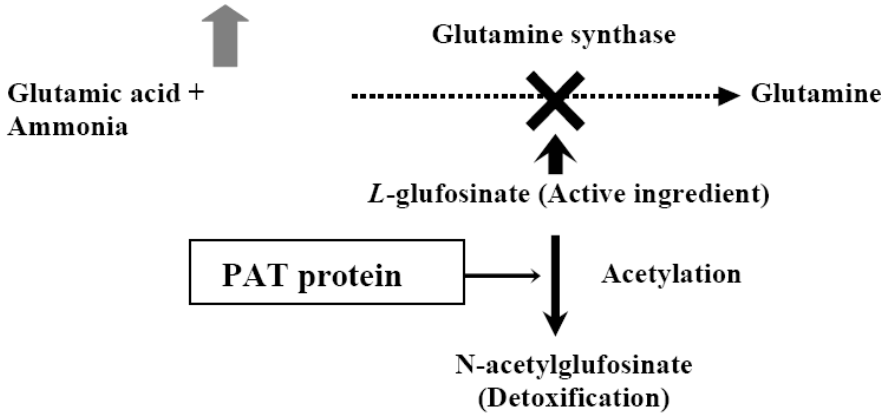


Figura 1. Mecanismo de acción de la proteína PAT

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.

Los resultados del protocolo de investigación que tuvo como objetivo evaluar los posibles efectos sobre organismos no blanco como parte de la biodiversidad se encuentran en el reporte de resultados correspondiente al permiso B00.04.03.02.01.-6031 de la solicitud 053_2009, a partir de la página 25. En dichos resultados no se observa ningún efecto sobre las poblaciones de insectos benéficos.

Adicionalmente, se realizaron estudios para determinar la equivalencia agronómica, en dichos estudios se observa que los maíces con el evento se comportan agronómicamente igual que su contraparte convencional excepto por la resistencia a algunos lepidópteros, por lo que no hay alteraciones en el fenotipo que pudieran afectar a la biodiversidad. Los resultados de la primera fase experimental se presentan a partir de la página 23 del reporte de resultados correspondiente al permiso B00.04.03.02.01.-6031 de la solicitud 053_2009.

En este segundo ciclo de evaluación se confirmó nuevamente que el maíz genéticamente modificado es agronómicamente equivalente a su isohíbrido convencional como se demuestra en este reporte de resultados a partir de la página 26.

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

Una ruta metabólica es una serie de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula catalizadas por enzimas, para formar un producto metabólico cuyo objetivo puede ser su utilización o almacenamiento en la célula, o la iniciación de otra ruta metabólica. Muchas de estas rutas son elaboradas e involucran una modificación paso a paso de la sustancia inicial para darle la forma del producto con la estructura química

deseada. La ruta metabólica consta de un principio, una parte intermedia, y una final, donde se necesitan sustratos y enzimas para obtener un producto metabólico.

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 esperan 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 µgr en proteínas vegetales de hoja, de 126 a 190.5 pg de de proteína Cry1F por µg de proteínas en el polen de la plantas, de 37 a 133 pg de proteína Cry1F por µg de proteína vegetal en la seda, de 550 a 1450 pg de proteína Cry1F por µg de proteína vegetal en el tallo y de 89.8 a 116 pg de proteína Cry1F por µg 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 CrylF 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 CrylF 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 CrylA (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 en el laboratorio de Pioneer Hi-Bred Int en Estados Unidos sobre la composición nutricional del maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1y su contraparte convencional, 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).

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. Los resultados del protocolo de equivalencia agronómica entre el maíz genéticamente modificado y su contraparte convencional se encuentran a partir de la página 23 del reporte de resultados correspondiente al permiso B00.04.03.02.01.6031 de la solicitud 053_2009.

En este segundo ciclo de evaluación los resultados fueron ratificados al demostrarse nuevamente que el maíz DAS-Ø15Ø7-1 es equivalente agronómicamente a su isohíbrido. Los resultados de este segundo ciclo se encuentran a partir de la página 26 de este reporte.

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

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 similaridad 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-Ø15Ø7-1no 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 reporte de resultados correspondiente al permiso B00.04.03.02.01.6031 de la solicitud 053_2009, a partir de la página 25. Los resultados no muestran ningún efecto negativo en los insectos que no son blanco de esta tecnología.

Durante el 2010 se evaluó la dispersión y calidad de polen, con el objetivo de conocer la distancia a la cual el polen se transporta en la Ecoregión donde se llevaron a cabo los estudios, así mismo se hicieron pruebas de calidad para determinar su viabilidad una vez que está expuesto al ambiente. Los resultados se presentaron en el reporte final del permiso B00.04.03.02.01.6031, a partir de la página 45; esto con la finalidad de subsanar la preocupación de las autoridades Mexicanas respecto a la posible introgresión de transgenes que pudiera presentarse en maíces convencionales.

En este segundo ciclo de experimentación se llevo a cabo el estudio **"Análisis del flujo de polen de maíz amarillo en San Pedro de las Colonias, Coahuila, México"**, con el objetivo de obtener las tasas de dispersión del polen en la Ecoregión donde se llevaron a cabo los estudios. Este estudio se presenta como parte de los anexos que integran este reporte de resultados.

VII. Efectos de las prácticas de uso y aprovechamiento

En términos de la relación costo-beneficio, 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 del capítulo II correspondiente a la eficacia biológica y a beneficios potenciales del evento DAS-Ø15Ø7-1 que se encuentran a partir de la página

29 del reporte correspondiente al permiso B00.04.03.02.01.6031 de la solicitud 053_2009.

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

- 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
- Barry, G., Kishore, G., Padgette, 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

REPORTE DEL PERMISO B00.04.03.02.01.-4867 PARA EVALUAR EL MAIZ CON EL EVENTO DAS-Ø15Ø7-1 EN CHIHUAHUA

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Reporte Final Febrero 2012

INTRODUCCIÓN

La Ley de Bioseguridad establece los requisitos que deben cumplirse para importar y evaluar maíz transgénico. En apego a estas disposiciones PHI México S.A. de C.V y Dow Agrosciences de México S.A de C.V. recibieron de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria Acuícola y Pesquera el permiso B00.04.03.02.01.-4867 para sembrar maíz genéticamente modificado con el evento DAS-Ø15Ø7-1 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 y el dispersión de polen.. **Esta es la segunda evaluación en etapa experimental que se hace del evento DAS-Ø15Ø7-1 en la Laguna; la primera evaluación se realizó en el ciclo 2010.**

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.

Pioneer Hi Bred International y Dow AgroSciencies han desarrollado el evento DAS-Ø15Ø7-1, a través del uso de técnicas de ADN recombinante. Las plantas de maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 expresan la proteína Cry1F que proviene de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis aizawai* (*Bt*). Esta proteína tiene función insecticida y confiere a la planta resistencia al ataque de diferentes insectos lepidópteros. La proteína

Cry1F contenida en el maíz, 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 del orden Lepidoptera es alcalino lo cual favorece la solubilización del cristal proteínico. La proteína solubilizada es subsecuentemente activada por las proteasas del intestino del insecto, la cual 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. Esta proteína Cry1F es específica para lepidópteros y es considerada inocua para mamíferos, pájaros e insectos no-blancos, ya que esta proteína no se solubiliza y no se disuelven en los intestinos ácidos de estos organismos no-blanco que incluyen a los insectos depredadores y parasitoides (Castillejos, *et al*., 2000).

Los objetivos de esta investigación en el segundo ciclo experimental, fueron: a) Evaluar la Eficacia Biológica del evento DAS-Ø15Ø7-1 frente al ataque de insectos lepidópteros bajo las condiciones en las que se desarrolla el maíz en la región de La Laguna, b) Generar datos que permitan estimar si la modificación genética del evento DAS-Ø15Ø7-1 ha alterado la equivalencia agronómica en comparación con su control no modificado (Isohíbrido) y c) Determinar la distancia a la cual se dispersa el polen de maíz amarillo en un lote de maíz blanco

MATERIALES Y METODOS

Localización y Característica de la Parcela

El presente experimento se llevó a cabo en el municipio San Pedro de la Colonias en el Estado de Coahuila..

Los lotes seleccionados para los experimentos estuvieron aislados a una distancia de al menos 600 m de otros lotes en los que se sembraba el mismo cultivo para evitar el flujo de polen en ambos sentidos; así mismo, la fecha de siembra fue el 6 de julio del 2011 y se realizó un mes después de las fechas de siembra utilizadas en la región, para evitar

coincidencia en la polinización del maíz transgénico con el de la región. El área experimental que ocupó un total de 713 m^2 dentro de la parcela de liberación, fue rodeada con la siembra simultánea de 4 surcos de bordo 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. La superficie total sembrada con el maíz GM DAS-Ø15Ø7-1 fue de 128 m^2.

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

Material Genético

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizó un híbrido de maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1, su isohíbrido, y un híbrido de referencia.

Diseño Experimental

El lote experimental se sembró el 6 de julio del 2011 conforme al protocolo autorizado por la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria Acuícola y Pesquera.

El diseño experimental utilizado fue de parcelas divididas, en un arreglo de bloques al azar con 4 repeticiones para cada tratamiento.

Tratamientos

Eficacia Biológica

La parcela grande consistió de 2 tratamientos; 1) infestación natural y 2) control insecticida (Figura 1). La parcela chica consistió de 10 surcos sembrados con tres híbridos, uno al lado del otro:

- 2 surcos del híbrido de referencia
- 4 surcos del isohibrido
- 4 surcos de maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1.

HREF	ISO	DAS	HREF	ISO	DAS
HREF	ISO	DAS	HREF	ISO	DAS
HREF	ISO	DAS	HREF	ISO	DAS
HREF	ISO	DAS	HREF	ISO	DAS

ISO	Isohibrido (Control insecticida)	ISO	Isohibrido (Infestación natural)
DAS	DAS (Control insecticida)	DAS	DAS (Infestación natural)
HREF	Hibrido de referencia (Control insecticida)	HREF	Hibrido de referencia (Infestación natural)

Figura. 1. Diseño experimental para evaluar la eficiencia biológica y equivalencia agronómica del evento DAS-Ø15Ø7-1. HREF=hibrido de referencia, ISO= isohibrido y DAS= DAS-Ø15Ø7-1

La parcela útil fueron los dos surcos centrales de cada material evaluado excepto el de referencia que solo se usó 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 m^2 y la del experimento 713 m^2, incluyendo calles y bordos (cuatro surcos); cada surco fue ajustado a 30 plantas para evitar diferencias en tratamientos y repeticiones. Los tratamientos evaluados en el presente experimento fueron:

Parcelas grandes:

1. Control insecticida
2. Infestación natural

Parcelas chicas (apareadas)

1. Isohibrido
2. Híbrido con el evento DAS-Ø15Ø7-1

El tratamiento insecticida se aplicó en etapa V2-V4; se aplicó Pounce a la dosis comercial recomendada en la etiqueta del producto. El insecticida se diluyo en un recipiente de plástico para homogenizar la mezcla y posteriormente se aplicó con una aspersora de mochila.

Variables evaluadas

Eficacia biológica.

1. **Daño foliar por gusano Cogollero (***Spodoptera frugiperda).* En las etapas vegetativas, V2-V4, V6-V8 y V10 (hojas por planta), se evaluaron 5 plantas de los surcos centrales de maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 y 5 de su respectivo 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, 1983a, b) (Tabla 2), 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 ½ - 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, 1983a, b

2. **Daño por Gusano Elotero en mazorca (***Helicoverpa zea)***.** En la cosecha, se evaluaron10 mazorcas tomadas al azar de los surcos centrales del maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y 10 de su Isohíbrido en cada una de las parcelas. Se

midió la extensión (cm) de las galerías causadas por Gusano Elotero con la ayuda de un vernier.

3. **Daño por Gusano Barrenador del tallo (***Diatraea spp,)* El día anterior a la cosecha se evaluaron 10 plantas tomadas al azar de los surcos laterales de DAS-Ø15Ø7-1 y 10 de su Isohíbrido en cada una de las parcelas. El tallo de cada planta se cortó longitudinalmente de la base al quinto entre nudo y se determinó si existía daño por barrenador y, en su caso la longitud de la galería en cm.

Equivalencia agronómica.

La equivalencia agronómica se evaluó en la parcela con control de insecticida y se evaluaron los siguientes parámetros:

~~1.~~ **Vigor de plántula (VP).** Cuando el maíz alcanzo 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. **Staygreen (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 principal. 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 10 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),** Previo a 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 30^0respecto de la vertical

10. **Conteo 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 del grano (PG).** La cosecha se realizó el día 12 de diciembre 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 (HG).** La humedad del grano por parcela y material, se determinó con un medidor marca John Deere SW 08120.

13. **Pudrición del tallo (PT).** El día de la cosecha se evaluaron 10 plantas de los surcos laterales de DAS-Ø15Ø7-1 y 10 de su Isohíbrido en cada una de las parcelas. El tallo de cada planta se cortó longitudinalmente desde la altura del

cuarto entre nudo hacia la base; 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 (PM).** Al momento de la cosecha se estimó la severidad 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 (LL_M).** Esta variable se estimo 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 o infértil que equivale a cero por ciento de granos formados y 5 es óptimo o el 100% de granos formados en la mazorca.

16. **Numero de mazorcas cosechadas (NM).** La cosecha se llevó a cabo en los dos surcos centrales y de forma manual, posteriormente se contabilizo el numero de mazorcas de cada material y se colocaron en un saco donde fueron etiquetadas

17. **Rendimiento (R).** 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:
    Rendimiento (ton/ha) = (((100-%Hum)/86) x Peso de Campo)/L x W x N x 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 se realizó el día 12 de diciembre 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, 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 del cultivo fueron destruidos con un molino y todo el material resultante fue incorporado al suelo por medio de una rastra.



Figura 2. Cosecha de los experimentos para evaluación de eficacia y equivalencia de maíz en San Pedro de las Colonias, Coahuila.

Post-cosecha

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

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza para las variables de equivalencia agronómica y de eficacia biológica. Los datos se procesaron en el paquete SAS (2004) utilizando un diseño experimental de parcelas divididas con parcela chica apareadas. Las medias de cada parámetro evaluado se compararon utilizando la Prueba de Tukey al (P> 0.05).

RESULTADOS Y DISCUSION

Eficacia Biológica

Daño por Gusano Cogollero *(Spodoptera frugiperda)*.

Se encontraron diferencias significativas (P=0.05) en el daño causado por Gusano Cogollero entre materiales (Isohíbrido y DAS-Ø15Ø7-1) y tratamientos (con y sin control insecticida), (Figura 3). El daño por Cogollero en el isohíbrido fue de 2.72 y 2.49 en la escala de Davis para las parcelas con infestación natural y con control insecticida, respectivamente. Este daño fue significativamente mayor al registrado en el maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 que presentó un valor de 1.0 (sin daño o algunas perforaciones) en las parcelas con infestación natural y con control insecticida (Figura 3). La aplicación de insecticida no tuvo un efectos significativo en el daño causado por el gusano Cogollero.

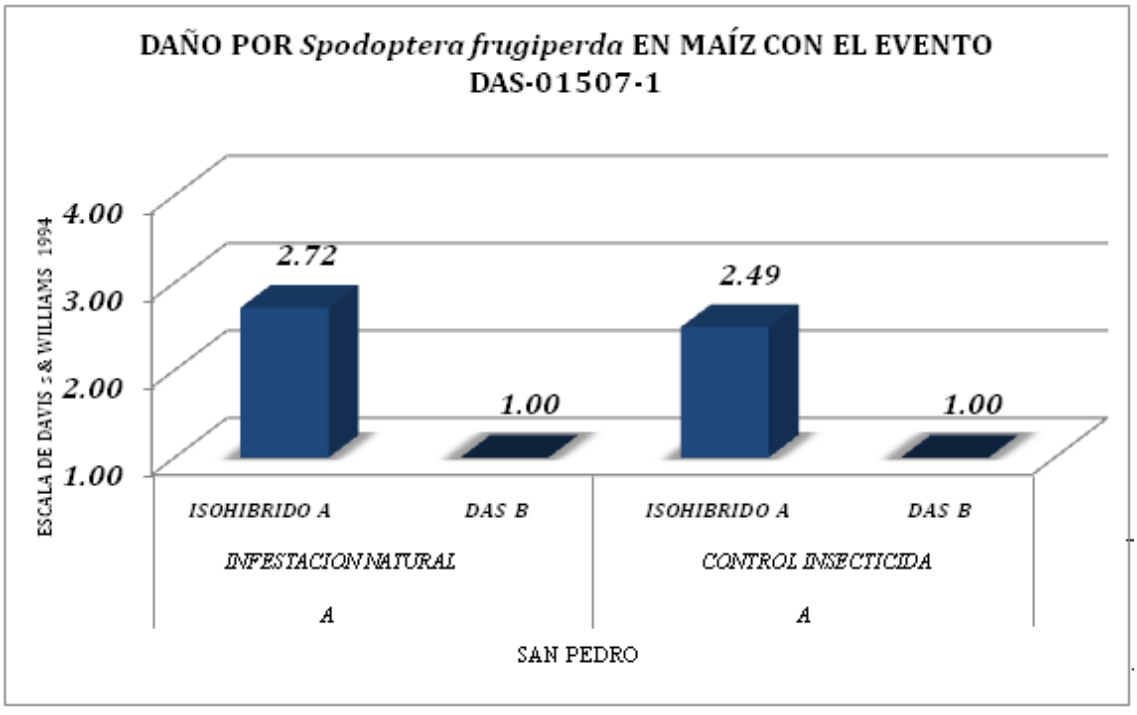


Figura 3. Daño por gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* expresado en la escala de Davis en parcelas sembradas con maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 (DAS) y su Isohibrido (ISO DAS) San Pedro de las Colonias, Coahuila., ciclo primavera/otoño 2011. Tratamientos seguidos por la misma letra, en el eje horizontal no difieren significativamente (Tukey 0.05).

Al analizar el porcentaje de plantas con daño por Cogollero, se confirmó la eficacia de la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 para reducir los daños causados por la plaga se encontraron diferencias significativas entre el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido que (Figura 3). La aplicación de insecticida no afecto el porcentaje de plantas con daño por Cogollero. Estos resultados son similares a los encontrados al evaluar la respuesta de los materiales al Cogollero según la escala de Davis (Figuras 3 y 4).

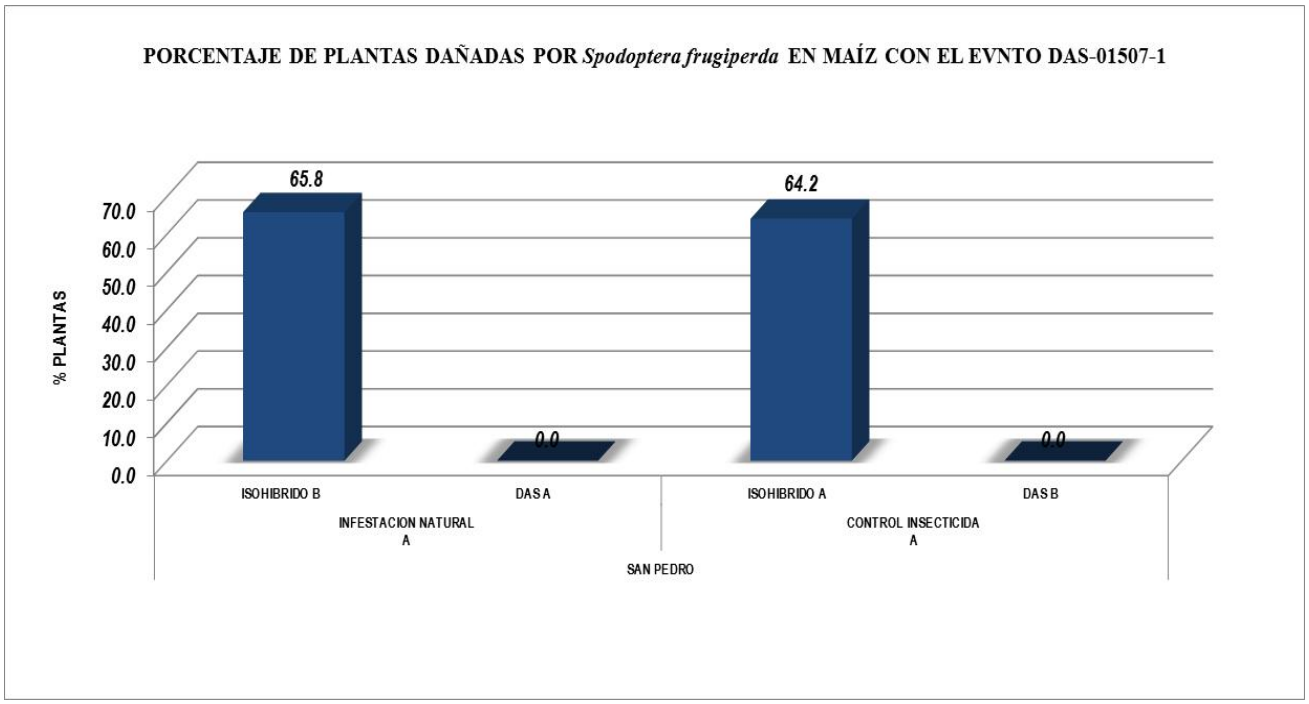


Figura 4. Incidencia de gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* expresado en porcentaje de plantas con daño en parcelas sembradas de maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 (DAS) y su Isohibrido en San Pedro de las Colonias, Coah., ciclo primavera/otoño 2011. Tratamientos seguidos por la misma letra en el eje horizontal, no difieren significativamente (Tukey 0.05).

Al graficar el daño por Cogollero durante las etapas de desarrollo del maíz en las parcelas con diferentes tratamientos, se observa claramente la diferencia entre el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido (Figura 6). El porcentaje de plantas con daño se incrementó hasta llegar a la etapa V2-V4 y posteriormente declinó en la etapa V6-V8, para luego incrementarse ligeramente en la etapa V10. La aplicación de insecticida en V2-V4 no afectó el desarrollo el progreso del daño causado por Gusano Cogollero.

Los resultados permiten confirmar la conclusión del ciclo 2010, en el sentido de que el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 es resistente al Gusano Cogollero, como lo indican las diferentes variables utilizadas para evaluar la eficacia biológica del evento y las observaciones de campo en el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1. (Figura 5)



Figura 5 Plantas con Daño por Gusano Cogollero en el Iosohibrido y Plantas sin daño en plantas de maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 en San Pedro de las Colonias, Coahuila, ciclo 2011.

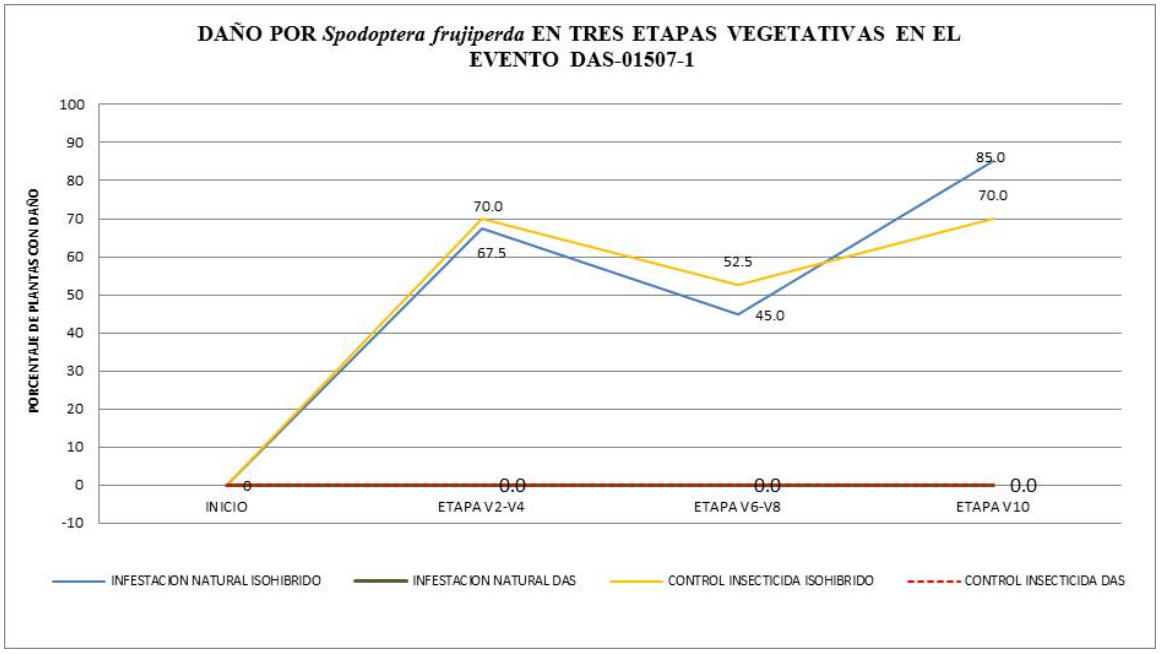


Figura 6. Progreso temporal del del daño por gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda*en diferentes etapas de desarrollo del maíz híbrido DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohibrido en San Pedro de las Colonias, Coahuila, ciclo primavera 2011.

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

La incidencia del barrenador del tallo en las parcelas del Isohíbrido fue de 0.03% (2 plantas) y el promedio de las galerías en los tallos afectados por la plaga fue de 2.0 cm. A pesar de que en el maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 no se detectaron plantas con daño por gusano barrenador del tallo, la baja incidencia no permitió hacer una comparación estadísticamente válida con su Isohíbrido.

Daño por Gusano Elotero *(Helicoverpa zea)*

No se detectaron diferencias significativas en la longitud de las galerías causadas por el Gusano Elotero en la parcela experimental (Figura 7). El maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 presentó una longitud promedio de galerías de 2.04 cm mientras que en el Isohibrido las galerías midieron en promedio 1.73 cm. La baja concentración de la proteína Cry1F en el grano (71-114 ng/mg de proteína) tiene un cierto grado de supresión, pero se requiere que la plaga ingiera cantidades considerables de semilla para intoxicarse, cantidades que probablemente no se alcanzaron en el las parcelas experimentales. En las hojas la proteína Cry 1F 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 se la cantidad de tejido ingerido sea pequeña (Figuras 3-6).

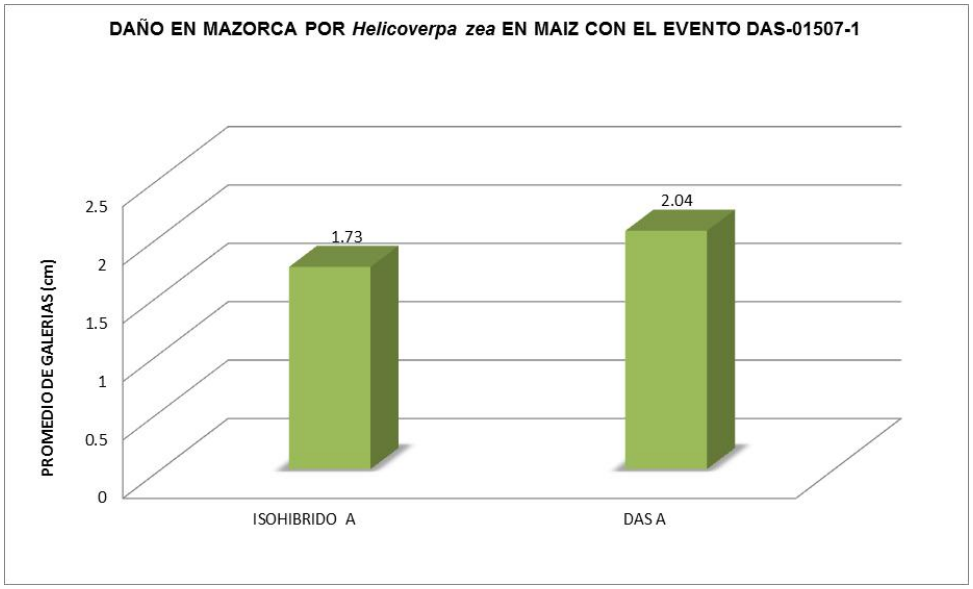


Figura 7. Longitud promedio de galerías causadas por *Helicoverpa zea* en mazorca de los híbridos DAS-015-07-1 y su Isohíbrido en la localidad de San Pedro de las Colonias, Coahuila. Tratamientos seguidos por la misma letra en el eje horizontal, no difieren significativamente (Tukey 0.05)



Figura 9. Daño pro Gusano Elotero en mazorcas de maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 en San Pedro de las Colonias, Coahuila, cilco 2011.

Rendimiento

No se detectaron diferencias significativas entre el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido. El maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 presentó rendimientos de 12.06 y 10.29 en las parcelas con infestación natural y control insecticida, respectivamente, mientras que el Isohíbrido presentó rendimientos de 10.5 y10.22, respectivamente (Figura 10). A pesar de la diferencia de casi 1.5 Ton entre el maíz con la tecnología DAS y su Isohíbrido esta no fue significativa estadísticamente, probablemente debido al efecto del reducido tamaño de la parcela sobre la variación entre repeticiones.

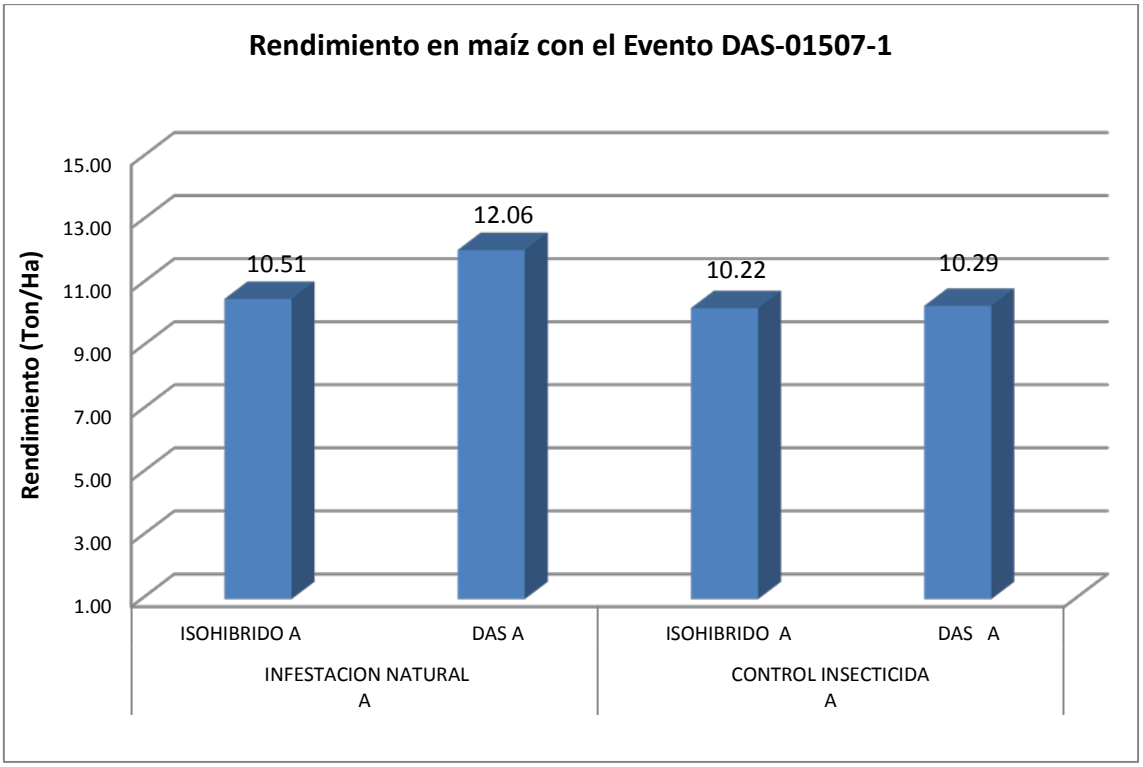


Figura 10. Rendimiento de maíz en ton/ha para el evento DAS-01507-1 para las localidades de San Pedro de las Colonias, Coahuila en el ciclo 2011.Tratamientos seguidos por la misma letra en el eje horizontal, no difieren significativamente (Tukey 0.05).

Equivalencia Agronómica

Se evaluaron 16 características fenotípicas y fisiológicas del cultivo para estimar si la modificación genética del evento DAS-Ø15Ø7-1 afectó significativamente la equivalencia agronómica en comparación con su isohíbrido.

Los porcentajes en el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido para la característica de Humedad de Grano (HG) fueron de 24.2% y 22.5%, respectivamente. Para Acame de Tallo (AT), los porcentajes fueron de 10% y 7.25%, mientras que para la variable de Mazorcas caídas, el maíz MON-ØØ81Ø-6 presentó un 0.0% y el isohíbrido un 0.5%, para el caso de Acame de Raíz (AR), ambos híbridos alcanzaron un 0.0%., (Tabla 3).

Tabla 3. Equivalencia agronómica entre el evento DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido en San Pedro de las Colonias, Coahuila, determinada de acuerdo al comportamiento de las características agronómicas del maíz evaluadas en porcentaje.

VARIABLE	ISO	DAS-Ø15Ø7-1
HG	22.5	24.2
MC	0.5	0.0
AT	7.25	10.0
AR	0.0	0.0

HG.- Humedad del grano; MC.- Mazorcas caídas; AT.- Acame de tallo; AR.-Acame de raíz

No se encontró diferencia entre el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido para las 4 características agronómicas que se evalúan con escalas: pudrición del tallo (PT), pudrición de la mazorca (PM), vigor de planta (VP) y staygreen (SG) ya que ambos maíces presentaron valores que corresponden a la misma categoría (Tabla 4).

Tabla 4. Equivalencia agronómica entre el evento DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido en San Pedro de las Colonias, Coahuila, determinada de acuerdo al comportamiento de las características agronómicas del maíz evaluadas con escala

VARIABLE	ISO	DAS-Ø15Ø7-1	CATEGORÍA
PT	9	9	***Sin síntomas***
PM	7.0	9	***Ligero – Sin síntomas***
VP	9	9.0	-
SG	8.0	8.0	-

PT.-Pudrición del tallo; PM.-Pudrición de la mazorca; VP.- Vigor de planta; Em.- SG.- Staygreen

En cuanto a las ocho características agronómicas cuantitativas que se compararon mediante análisis estadístico, se demostró la equivalencia del maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido para las variables: número de mazorcas (NM), peso

del grano (PG), días a floración masculina (DFM) y femenina (DFF) y conteo final (CF) Solo la altura de planta (AP), altura de mazorca (AM) y la Emergencia (Em) resultaron con diferencias significativas entre la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido, la altura de planta y mazorca pueden estar asociadas con el grado de protección que presenta el maíz con la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 contra Gusano Cogollero. La diferencia en los valores de Emergencia posiblemente esté relacionada con la calidad de la semilla empleada.

Tabla 5. Equivalencia agronómica entre el evento DAS-Ø15Ø7-1 y su Isohíbrido en San Pedro de las Colonias, Coahuila, determinada de acuerdo al comportamiento de las características agronómicas del maíz evaluadas estadísticamente.

VARIABLE	ISO	DAS-Ø15Ø7-1	TUKEY
NM	52.7	53.5	NS
PG	8.1	9.0	NS
EM	46.2	50.1	NS
DFM	54	54	NS
DFF	54	54	NS
AM	0.91	0.94	*
AP	1.7	1.8	*
CF	28.6	29.5	NS

NM.- Número de mazorcas cosechadas; PG.- Peso de grano; Em.- Emergencia; DFM.- Días a floración masculina; DFF.- Días a floración femenina;; AM.- Altura de mazorca; AP.- Altura de planta; CF.-Conteo final.

CONCLUSIONES

Eficacia Biológica

1. El maíz con el evento DAS-Ø15Ø7-1 es resistente al ataque de Gusano Cogollero (*Spodoptera frugiperda),* en la localidad de San Pedro de las Colonias, Coahuila en la región de la Laguna.
2. La densidad de población de Gusano Barrenador *del tallo* (*Diatraea spp.) y de* Gusano Elotero (*Helicoverpa zea)* fue muy baja, por lo que no fue posible evaluar estadísticamente la eficacia de la tecnología DAS-Ø15Ø7-1 contra estas plagas.

Equivalencia Agronómica

3. El híbrido geneticamente modificado DAS-Ø15Ø7-1 fue agronómicamente equivalente a su isohíbrido en la localidad de San Pedro de las Colonias en la región de la Laguna.

REFERENCIAS.

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

Clark et al., 2005 citado por Ibarra et al 2011. Análisis e integración de la iformación sobre OGM´s con evento Bt.: Reporte final por el análisis de riesgo por su liberación. CINVESTAB-Campus Guanajuato, Irapuato, Gto. México. *www.ine.gob.mx/descargas/bioseguridad/ogm_bt.pdf*

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

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 *(Pierisbrassicae).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. and Williams, W.P. 1989. Mechanisms of resistance in corn to leaf feeding by southwestern corn borer and European corn borer (Lipidoptera: *Phyralidae*). *J. Economic. Entomology.*, 82: 919-922.

Davis, F.M., Williams, W.P. and Wiseman, B.R. 1989. Methods used in screening and determining mechanisms of resistance to the southwestern corn borer and fall army-worm. 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 resistence to corn earworm, *Heliothiszea*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT, El Batan, México. 16 pp.

Castillejos Vasty, García Luis, Cisneros Juan, GoulsonDave, D. Cave Ronald, Primitivo Caballero
& Williams Trevor. 2000. The potential of *Chrysoperla rufilabris* and *Dorutaeniatum*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. *Diatraeasaccharalis.*