



## **INFORMACIÓN NO CONFIDENCIAL**

---

---

**SOLICITUD DE LIBERACIÓN EXPERIMENTAL AL  
AMBIENTE DEL HÍBRIDO HÍBRIDO DE MAÍZ  
ROUNDUP READY® (EVENTO MON-00603-6 O NK603)  
PARA LAS REGIONES DE CUAUHEMOC Y  
DELICIAS/JIMÉNEZ EN EL ESTADO DE CHIHUAHUA**

---

---

**PHI MÉXICO SA DE CV  
DOW AGROSCIENCES DE MEXICO SA DE CV**

## **I. Caracterización del OGM**

### **a) Identificador único del evento de transformación**

Nombre científico: *Zea mays* L.

Nombre común: Maíz.,

Nombre del evento: MON-00603-6 o NK603

El organismo genéticamente modificado es un híbrido de maíz desarrollado mediante transformación genética con el evento MON-00603-6, también denominado maíz Roundup Ready® NK603, que expresa la proteína CP4 EPSPS, de *Agrobacterium sp.* Cepa CP4 y CP4 EPSPS L214P, de *Agrobacterium sp.* Cepa CP4 el cual pertenece a Monsanto Company.

### **b) Especies relacionadas con el OGM y distribución de estas en México**

### **c) Especificación de la existencia de especies sexualmente compatibles**

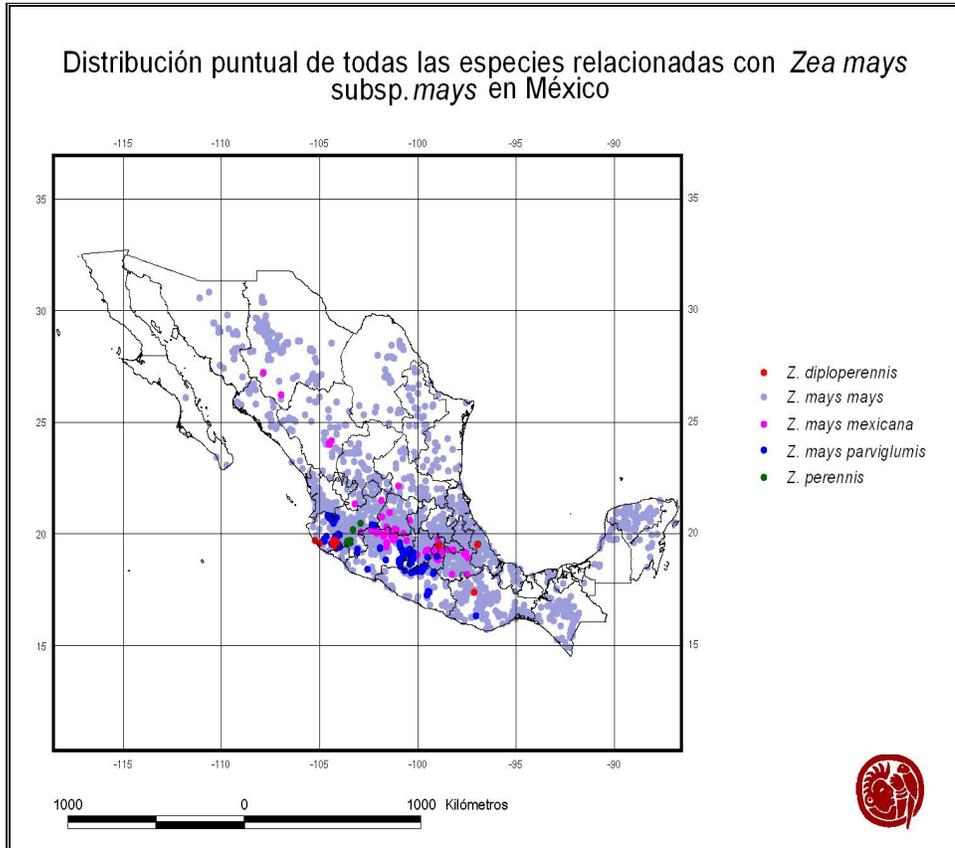
El género *Zea* incluye además del maíz otras especies silvestres conocidas colectivamente como teocintles. Los teocintles presentes en México son: *Zea diploperennis* y *Zea perennis*, dos especies perennes que se encuentran localizadas en el estado de Jalisco. Además existen subespecies de *Zea Mays*, *Zea mays spp. mexicana*, un teocintle silvestre anual ampliamente distribuido en las regiones altas del centro de México y el *Zea mays spp. parviglumis*, un teocintle silvestre del sur y occidente de México (Figura 1). Existen otros teocintles silvestres: *Zea luxurians* y *Zea mays spp. huuetenangensis*, sin embargo estos no se han reportado en México. Todos los teocintles con excepción del tetraploide *Z. perennis* pueden cruzarse con el maíz para formar híbridos fértiles (Wikes, 1977, Doebley, 1990). Sin embargo estudios recientes indican que la dirección de la polinización en su gran mayoría es del teocintle (*spp. mexicana*) hacia el maíz (Baltasar et al, 2005) debido a la presencia de barreras genéticas de incompatibilidad (Evans y Kermicle, 2001) y factores físicos de las plantas de teocintle los cuales no permiten que el polen de maíz polinicen los estigmas del teocintle

**Tabla 1.** Lista de especies emparentadas con el maíz. Poblaciones de teocintle en México y Guatemala rara vez se presentan en un solo lugar=● Indeterminada=■ Estable=▲ Poca=○ . Garrison H.1995.

Población y su estado	Nombre común	Lugar	Extensión	Hábitat
Nabogame ●	maicillo.	Valle Tarahumara en la Sierra Madre del estado de Chihuahua, unos 16 km al noroeste de Guadalupe y Calvo.	No más de 30 km <sup>2</sup> en el fondo del valle.	A lo largo de los márgenes de las milpas y en los bosquesillos de sauces que bordean las corrientes de agua.
Durango ●	maicillo.	Valle de Guadiana, a 10 km de Durango, en el estado de Durango.	No más de 20 km <sup>2</sup> .	Limitado a las tierras no cultivadas a lo largo de los canales de riego.
Mesa Central ■	maíz de coyote.	Poblaciones aisladas en toda la meseta central en Jalisco, Michoacán y Guanajuato. La población continua más grande está en la región al norte del lago Cuitzeo.	En la antigüedad fue una población continua que abarcaba miles de kilómetros cuadrados, pero ahora existe en áreas aisladas dispersas, que rara vez tienen más de 10 km <sup>2</sup>	Se presenta en los campos cultivados y a lo largo de éstos o en las áreas cercadas protegidas del pastoreo
Chalco ■	acece o acece (inconveniente o desagradable).	Valle de México desde Amecameca hasta Xochimilco, Chalco y Los Reyes. Poblaciones aisladas alrededor de Texcoco.	La población principal se concentra en un área de 300 km <sup>2</sup> alrededor de Chalco. La semilla ha viajado a Toluca y Puebla en el estiércol del ganado lechero.	Se le encuentra casi exclusivamente en las milpas como una "imitación" del maíz, pero también como maleza a lo largo de los caminos.
Balsas ▲	maíz de huiscatote (correcaminos).  maíz de pájaro, atzintzintle.	Los cerros que rodean la cuenca del río Balsas. La población está distribuida en forma discontinua, con una parte situada al sur de Chilpancingo, en el estado de Guerrero, y la otra en el borde septentrional de la cuenca, extendiéndose en Michoacán y la costa de Jalisco.	La población al sur de Chilpancingo abarca cientos de kilómetros cuadrados, mientras que la otra se extiende por miles de kilómetros cuadrados en los estados de Guerrero, Michoacán y México.	A veces se le observa en las milpas, pero en general se le encuentra en las densas laderas, especialmente a lo largo de las barrancas u otras áreas donde hay escurrimiento de la lluvia. Coloniza con éxito las milpas en barbecho. Los alambrados de púas y el ganado están cambiando este hábitat.
Oaxaca ●	Cocoxie (correcaminos)	San Francisco de Honduras, a 5 km de San Pedro Juchatengo, en la Sierra Madre del sur de Oaxaca.	No más de 20 km <sup>2</sup> , aunque pueden existir áreas aisladas externas. Es preciso explorar más el estado de Oaxaca para detectar poblaciones.	Crece en las laderas y en las milpas que rodean al pueblo.
Huehuetenango ○	milpa de rayo, salic.	Cerros y valles del departamento de Huehuetenango alrededor del pueblo guatemalteco de San Antonio Huista, cerca de la frontera con México.	Probablemente no más de 300 km <sup>2</sup> .	Se le encuentra a lo largo de los senderos, en los campos y en las laderas con milpas en barbecho. Las cercas de alambre de púas y el ganado han cambiado radicalmente este hábitat.
Guatemala ○	milpa silvestre, teocintle.	Distribuido en forma discontinua en el sureste de Guatemala en los cerros y valles de Jutiapa, Jalapa y Chiquimula.	Una vez estuvo distribuido en forma continua y abarcaba 500 ó más km <sup>2</sup> , pero ahora la distribución es fragmentada y la población más grande abarca cuanto más 1 km <sup>2</sup> .	Se presenta en pequeños sitios aislados a lo largo de los campos o en otras áreas protegidas del pastoreo.

Tamaño de las poblaciones: Balsas > Mesa Central > Chalco > Nabogame > Durango = Oaxaca.  
Necesidad más importante: Más exploración en Oaxaca y Chiapas.

**Figura 1.** Distribución Puntual de todas las especies relacionadas con *Zea mays* subsp *mays* en México.



[www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)

Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM)  
Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad

Otro pariente cercano del género *Zea* es el *Tripsacum*, un género de siete especies, todas las cuales se pueden cruzar artificialmente con *Zea*. Sin embargo la progenie resultante de estas cruces es generalmente estéril.

Debido a que las plantas genéticamente modificadas en el ensayo de campo propuesto serán desespigadas, no existe la posibilidad de cruce con parientes silvestres del maíz.

Sólo el *Z mays* spp. *mexicana* forma híbridos frecuentes con el maíz. Incluso donde el teocintle y el maíz crecen en la misma localidad y forman híbridos, cada uno de ellos mantiene las constituciones genéticas distintas, lo que sugiere que sería muy raro que llegase a ocurrir una introgresión, y en muy contadas ocasiones da lugar a cambios que se pueden mantener en cualquier población. Por ejemplo, los híbridos que se forman entre el teocintle y el maíz producen espiguillas que no tienden a dispersar la semilla y que son, por lo tanto, altamente seleccionadas considerando su naturaleza.

La evidencia molecular reciente ha confirmado que existe algo de flujo genético limitado entre el maíz y el teocintle lo cual puede ocurrir en cualquier dirección, pero que se presenta a

una frecuencia muy baja (Doebley 1990). Incluso si el polen genéticamente modificado fuese a fertilizar el teocintle para formar un híbrido viable, cualquier gen del maíz deberá conferir una ventaja selectiva muy fuerte sobre los teocintles silvestres a fin de continuar en la población de teocintle. La resistencia a las plagas de lepidópteros, tales como el barrenador del tallo, es poco probable que confiera esa ventaja selectiva tan fuerte, especialmente debido a que la resistencia a los insectos herbívoros es común entre las especies silvestres. Además, los fitomejoradores han hecho adelantos importantes en el desarrollo de híbridos de maíz comerciales con mayor resistencia a los insectos (Dicke y Guthrie 1988). Estos híbridos han estado ampliamente disponibles en América del Norte pero no ha habido un incremento perceptible en la conveniencia del teocintle.

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

El maíz (*Zea mays* L.) es una gramínea originaria y domesticada en México y se ha cultivado en Norteamérica por miles de años (CFIA, 1994). En la actualidad el maíz se siembra en la mayoría de los países del mundo y es el tercer cultivo de importancia económica a nivel mundial (después del trigo y el arroz).

Bajo condiciones climáticas adecuadas o mediante el aporte del riego, el maíz es muy productivo, y aunque es originaria de zonas semiáridas, las variedades mejoradas actuales sólo resulta rentable cultivarlas en climas con precipitaciones suficientes o bien en regadío. Puede crecer en zonas desde el nivel del mar hasta los 4000 metros, en una gran variedad de suelos. Requiere un clima relativamente cálido y agua en cantidades adecuadas; la mayoría se cultivan en regiones de temporal, de clima caliente y de clima subtropical húmedo. En temporal se siembra de abril a junio y su desarrollo se prolonga hasta agosto o septiembre.

Sin embargo al ser el maíz una planta altamente domesticada, esta no puede proliferar sin los cuidados necesarios que requiere como cultivo.

#### **e) Descripción taxonómica del organismo receptor y donador de la construcción genética**

##### Organismo receptor

Nombre Común; Maíz  
Nombre Científico; *Zea mays*  
Clase: Angiosperma  
Subclase; Monocotiledónea  
Orden; Graminales  
Familia: Poaceae  
Subfamilia: Panicoideae  
Tribu: Maydeae  
Genero: *Zea*  
Especie: *mays*

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie monocotiledónea anual que pertenece al genero *Zea*. A diferencia de los demás cereales, es una especie monoica, lo que significa que sus inflorescencias, masculina y femenina, se ubican separadas dentro de una misma planta por lo que tiene la

capacidad de autofecundarse y de efectuar polinización cruzada. Por consiguiente, existe la posibilidad de que la diseminación de genes se lleve a cabo vía el cruzamiento con otras parcelas de maíz cultivado o con especies silvestres.

#### Organismos donadores

Nombres Científicos: *Agrobacterium tumefaciens*  
*Agrobacterium sp*

#### **f) País y localidad donde el OGM fue colectado, desarrollado o producido**

La información referente al desarrollo del evento MON-00603-6 se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

#### **g) Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor**

Aylor, D., Baltasar, M.B. and Schoper J. 2005. Some physical properties of Teosinte (*Zea mays* subs. *Parviglumis*) Pollen. J. Exp Bot 56:2401-2407 .

Doebley, J. 1990. Molecular evidence of gene flow among *Zea* species. BioScience 40:443-448.

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

Wilkes, H.G. 1977. Hybridization of maize and teosinte in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. Econ Bot 34:254-293.

Eckardt, N.A. 2003. Maize genetics 2003. Meeting Report. The Plant Cell Rep. 15 (5) 1053-1055.

Weber A, Clark RM, Vaughn L, Sánchez-Gonzalez Jde J, Yu J, Yandell BS, Bradbury P, Doebley J. 2007. Major regulatory genes in maize contribute to standing variation in teosinte (*Zea mays ssp. parviglumis*). Genetics. 177(4):2349-59.

Doebley, J. 2004. The genetics of maize evolution. Annu Rev Gen. 2004;38:37-59.

#### **h) Secuencia génica detallada del evento de transformación, incluyendo tamaño del fragmento insertado. Sitio de inserción de la construcción genética, incluyendo las secuencias de oligonucleótidos que permitan la amplificación del sitio de inserción.**

La información relacionada con el Mapa del plásmido PV-ZMGT32 y el Mapa lineal de PV-ZMGT32L del evento MON-00603-6, se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

#### **i) Descripción de las secuencias flanqueantes, número de copias insertadas, y los resultados de los experimentos que comprueben los datos anteriores, así como la**

**expresión de mensajeros del evento de transformación genética, incluyendo la demostración de los resultados.**

La caracterización molecular del evento MON-00603-6 se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

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

La información relacionada con el Mapa del plásmido PV-ZMGT32 y el Mapa lineal de PV-ZMGT32L y la información relacionada con las proteínas CP4 EPSPS y CP4 EPSPS L214P, que confieren tolerancia al herbicida glifosato del evento MON-00603-6, se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**k) Descripción del método de transformación**

La información acerca del método de transformación genética se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

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

La caracterización molecular del evento MON-00603-6 se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

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

La información relacionada con las proteínas CP4 EPSPS y CP4 EPSPS L214P, que confieren tolerancia al herbicida glifosato del evento MON-00603-6, se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**n) Rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen y sus cambios**

La información relacionada con las rutas metabólicas involucradas en la expresión del transgen se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

- o) Productos de degradación de la proteína codificada por el transgen en subproductos**
- p) Secuencia nucleotídica de las secuencias reguladoras incluyendo promotores, terminadores y otras, y su descripción, número de copias insertadas, pertenencia de estas secuencias a la especie receptora, inclusión de secuencias reguladoras homólogas a la especie receptora.**

La caracterización molecular del evento MON-00603-6 se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**q) Patogenicidad o virulencia de los organismos donadores y receptores**

No existen características patogénicas o perjudiciales para la salud humana o animal relacionadas con los genes *pat* o *cp4 epsps* del evento MON-00603-6. Información relacionada con la patogenicidad o virulencia de este evento se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**(Ver Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms. Anexo I)**

**r) Genes de selección utilizados durante el desarrollo del OGM y el fenotipo que confieren estos genes de selección, incluyendo el mecanismo de acción de estos genes**

La información de los genes de selección empleados en la transformación se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**s) Número de generaciones que mostraron estabilidad en la herencia del transgen**

La información referente a la estabilidad genética se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**(Ver Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms. Anexo I)**

**t) Referencias bibliográficas de los datos presentados**

Ammann, K. 2005. Effects of biotechnology on biodiversity: herbicide-tolerant and insect-resistance GM crops. *TRENDS in Biotechnology* 23:388-394

Aylor, D., Baltazar, M.B. and Schoper J. 2005. Some Physical Properties of Teosintle (*Zea mays* subsp. *parviglumis*) Pollen. *J. Exp. Bot.* 56:2401-2407.

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

- Base de Datos de ICTV. 1998. 15.0.1.0.001 Cauliflower mosaic virus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/15010001.htm>).
- Brookes G. 2005. GM crops: the global socio-economic and environmental impact-the first nine years 1996- 2004. PG Economics Ltd. UK. 67.
- CFIA. 1994. Regulatory Directive Dir 94-11: The Biology of Zea mays L. (Corn/Maize) (Biología del Zea mays I. Canadian Food Inspection Ag., Plant Products Div., Plant Biotechnology Office, Ottawa.
- CFIA. 1998. Decision document 98-22: Determination of the safety of AgrEvo Canada Inc.'s glufosinate ammonium tolerant corn (Zea mays) lines, T14 and T25. Canadian Food Inspection Agency, Plant Health and Production Division, Plant Biotechnology Office, Ottawa
- Doebley, J. (1990). Molecular evidence for gene flow among Zea species. *BioScience* 40:443-448.
- Doebley, J. 2004. The genetics of maize evolution. *Annu Rev Gen.* 2004;38:37-59.
- Eckardt, N.A. 2003. Maize genetics 2003. Meeting Report. *The Plant Cell Rep.* 15 (5) 1053-1055.
- Evans, M.M.S. and Kermicle, J.L. 2001. Teosintle crossing barrier1, a locus governing hybridization of teosinte with maize. *Theor. Appl. Genet.* 103: 259-265.
- Galinat, W.C. 1988. Palomero Toluqueno and certain Andean maize carry the short rachillae and reduced cupule traits probably descended from an independent domestication of teosinte. *MNL* 62:111
- IFBC. 1990. *Safety Evaluation of Whole Foods and Other Complex Mixtures (Chapter 6)*. In: *Biotechnologies and Food: Assuring the Safety of Foods Produced by Genetic Modification* (Evaluación de la seguridad de alimentos enteros y otras mezclas complejas (Capítulo 6), En: *Biotechnologías y control de calidad de la seguridad de alimentos producidos mediante modificación genética*) International Food Biotechnology Council. (eds. Coulston, F. and Kolbye, Jr., A.C.). Published in: *Regulatory Toxicology and Pharmacology* Volume 12, No. 3, December 1990. Academic Press, Inc.
- Klein, T.M., E.D. Wolf, R. Wu, and J.C. Sanford. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- Luna, S., Figueroa, J., Baltazar, B., Gomez, R., Townsend, R., Schoper, J. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Sci.* 41: 1551-1557.
- USDA 1995. Availability of determination of no regulated status for genetically engineered corn. *Fed. Reg.*, 60, 134, pp. 36095-36096.
- [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad.
- Watson, S.A. 1987. *Structure and Composition*. pp. 53-82. In *Corn: Chemistry and Technology* (Estructura y composición, pp. 53-82. En *Maíz: química y tecnología*), S.A. Watson and P.E. Ransted (eds). American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota.
- Wilkes, H.G. 1977. Hybridization of maize and teosinte in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. *Econ Bot* 34:254-293.
- Weber A, Clark RM, Vaughn L, Sánchez-Gonzalez Jde J, Yu J, Yandell BS, Bradbury P, Doebley J. 2007. Major regulatory genes in maize contribute to standing variation in teosinte (*Zea mays ssp. parviglumis*). *Genetics*. 177(4):2349-59.
- White, P.J. and Pollak, L.M. 1995. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition, and Nutritive Values. *Cereal Foods World* 40: 756-762.
- Wilkes, H.G. 1977. Hybridization of maize and teosintle in México and Guatemala and the improvement of maize. *Econ. Bot.* 31: 254-293

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

La liberación se pretende realizar en campos de agricultores cooperantes bajo la supervisión de investigadores internos (de las compañías) así como de investigadores reconocidos de INIFAP u otras instituciones y se seguirán los protocolos de experimentación que se presentan en los **anexos III, IV y V**.

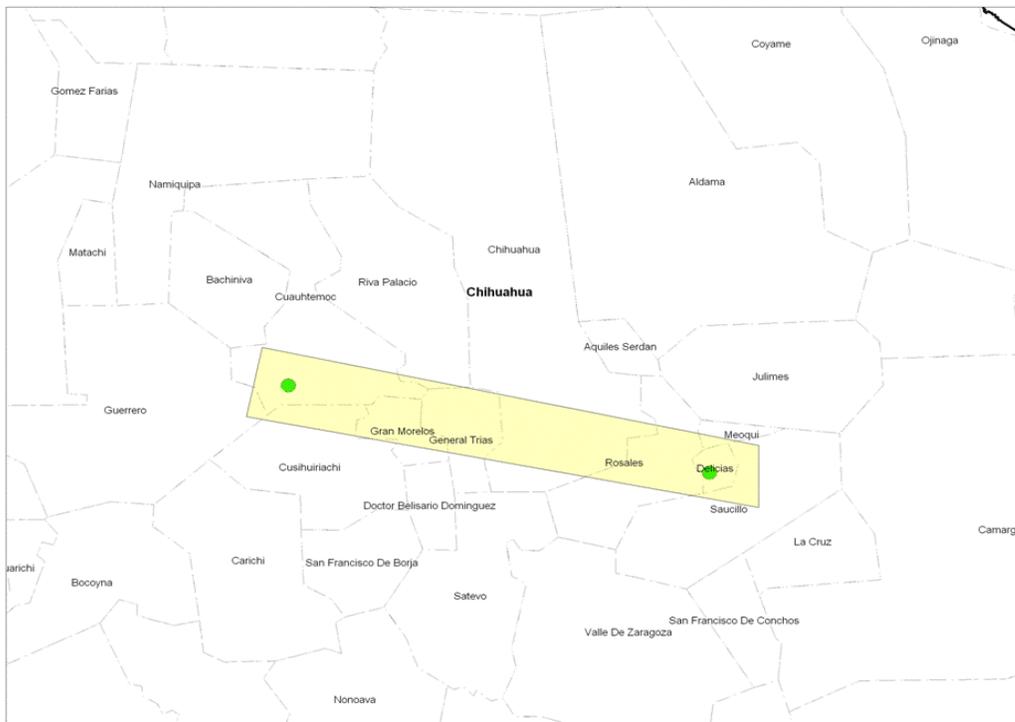
### a) Superficie total del polígono o polígonos donde se realizara la liberación

El polígono se describe en el inciso c abajo

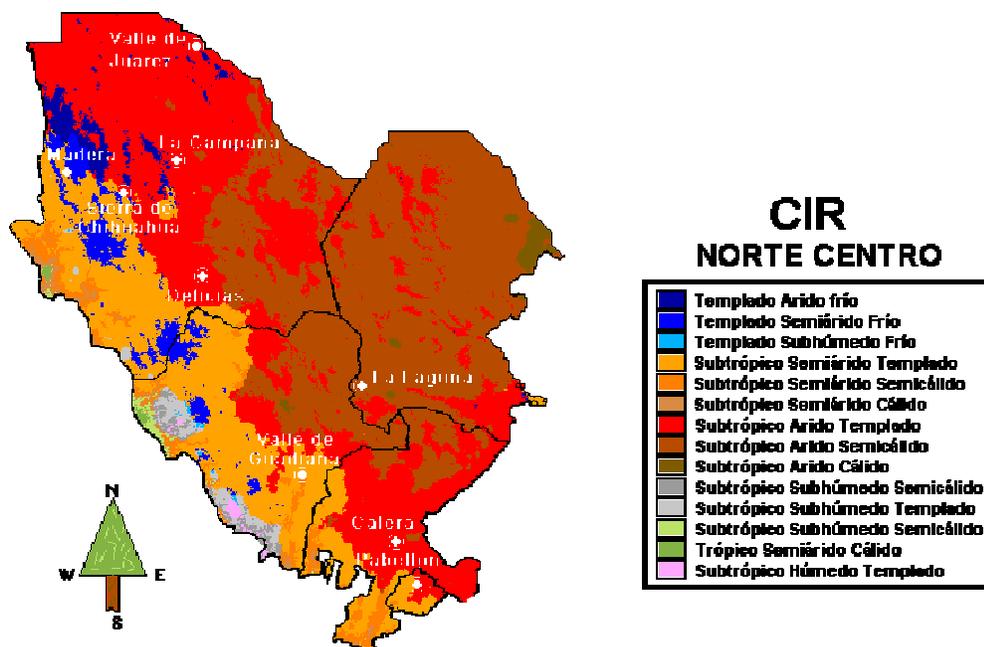
### b) Ubicación, en coordenadas de UTM, del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

Estado	Localidad	Coordenadas	Coordenadas
Chihuahua	Cuauhtemoc	28.38953	-106.95473
	Delicias/Jiménez	28.09758	-105.47784

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



1. Listado de especies sexualmente compatibles y de las especies que tengan interacción en el área de liberación y en zonas vecinas a éstos, incluir que especies se encuentran en las zonas potenciales de liberación si es que se cuenta con esa información
2. Descripción geográfica



3. Plano de ubicación señalando las principales vías de comunicación

Ver inciso c anterior

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

Literalmente miles de alimentos y productos industriales son derivados del maíz. El maíz o sus derivados no contienen riesgo alguno a humanos, animales domesticados o especies silvestres. El maíz es una de las fuentes alimenticias mas importantes en todo el mundo.

Información sobre los posibles riesgos en la liberación del evento MON-00603-6 se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

El evento de Maíz GM es sustancialmente equivalente al maíz tradicional excepto por la característica introducida.

**(Ver Opinion of the Scientific Panel on Genteically Modified Organisms. Anexo I)**

**a) Estabilidad de la modificación genética del OGM**

Información sobre la estabilidad genética se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

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

Los valores de niveles de expresión se encuentran en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**c) Características del fenotipo del OGM**

Las características del fenotipo del maíz con el evento MON-00603-6 se encuentran en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

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

Ninguna

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

La comparación de la expresión fenotípica se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

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

Los resultados hasta ahora observados en experimentos establecidos en otros países no han demostrado efectos no esperados en el desarrollo del maíz GM. El Ensayo de Bioseguridad en

México, pretende entre sus diversos objetivos obtener información que proporcione a las Agencias Reguladoras indicativos para la toma de sus decisiones en correlación a los posibles efectos no esperados, así como su evaluación, estimación, manejo y prevención.

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

Uno de los métodos de identificación del evento específico puede consultarse en el sitio: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603-WEB-Protocol%20Validation.pdf> (Ver anexo V)

#### **h) Existencia potencial de flujo génico del OGM a especies relacionadas**

Estudios recientes indican que la planta de teocintle produce más polen/planta y es más pequeño (~60-70 micrones), comparado con el polen del maíz (Aylor et al. 2005; Baltazar, et al. 2005). Los estudios de Luna, Baltazar, Aylor y colaboradores sugieren que bajo condiciones de campo es más factible que el polen de teocintle polinice estigmas de maíz a que el polen del maíz polinice estigmas de teocintle. Estas observaciones se sustentan en la presencia de barreras genéticas presentes en poblaciones silvestres de *Zea mays* ssp. *Mexicana* (Evans and Kermicle, 2001) y a factores morfológicos de la planta de teocintles que previenen de ser polinizada por polen de maíz.

Durante las épocas de siembra y en las localidades propuestas, es probable que otras compañías semilleras o agricultores siembren maíz en los alrededores de las localidades donde se ubican los sitios de los ensayos, existiendo la posibilidad de entrecruzamiento. Sin embargo debido a todas las medidas de bioseguridad que se utilizaran en los experimentos, se eliminará la posibilidad de transferencia de material genético de los ensayos a campos de agricultores locales.

**Figura 2.** El maíz pierde viabilidad rápidamente.

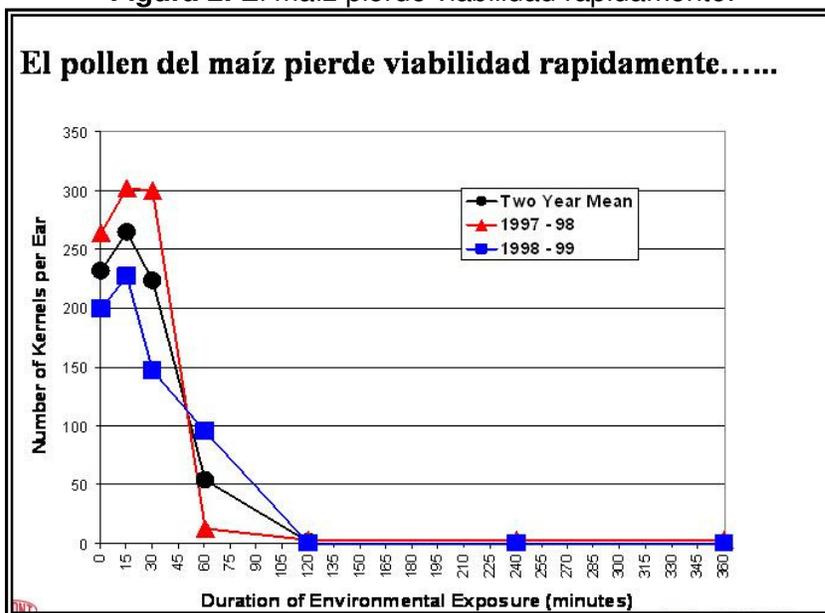


Figura 3. Polen y Estado Hídrico de la Atmósfera.

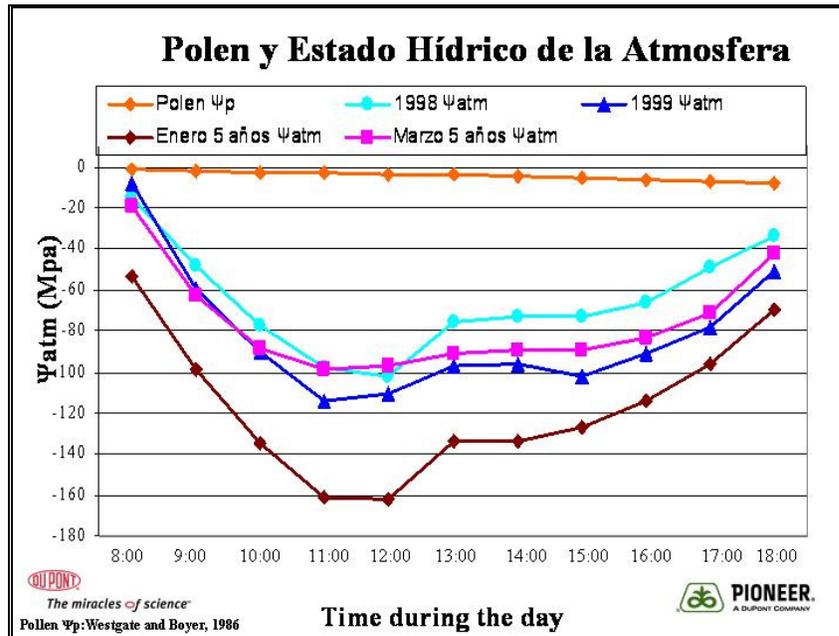
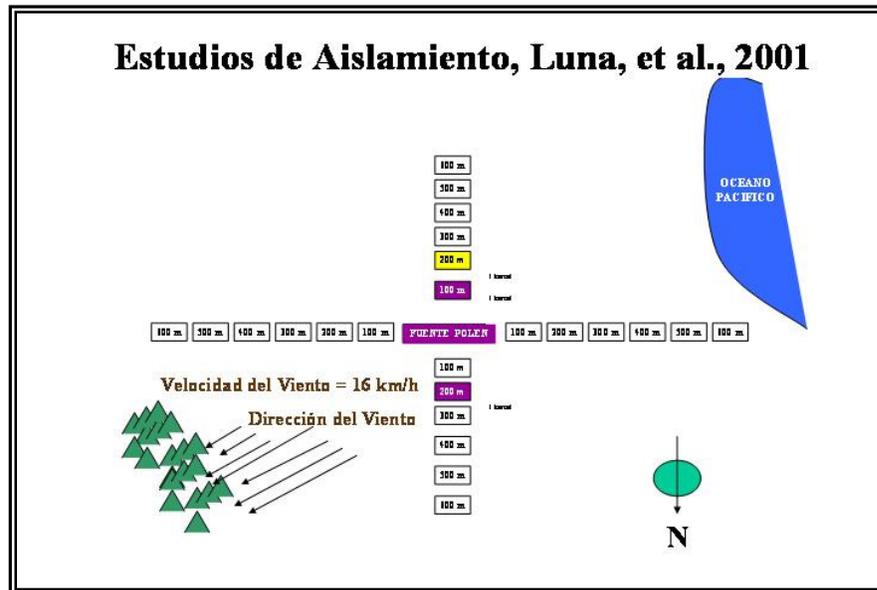


Figura 4. Estudios de Aislamiento.



Sólo el *Z mays* spp. *mexicana* forma híbridos frecuentes con el maíz. Incluso donde el teocintle y el maíz crecen en la misma localidad y forman híbridos, cada uno de ellos mantiene las constituciones genéticas distintas, lo que sugiere que sería muy raro que llegase a ocurrir una introgresión, y en muy contadas ocasiones da lugar a cambios que se pueden mantener en cualquier población. Por ejemplo, los híbridos que se forman entre el teocintle y el maíz producen espiguillas que no tienden a dispersar la semilla y que son, por lo tanto, altamente seleccionadas considerando su naturaleza.

La evidencia molecular reciente ha confirmado que existe algo de flujo genético limitado entre el maíz y el teocintle lo cual puede ocurrir en cualquier dirección, pero que se presenta a una frecuencia muy baja (Doebley 1990). Incluso si el polen genéticamente modificado fuese a fertilizar el teocintle para formar un híbrido viable, cualquier gen del maíz deberá conferir una ventaja selectiva muy fuerte sobre los teocintles silvestres a fin de continuar en la población de teocintle.

Figura 5. El maíz y el Teocintle.

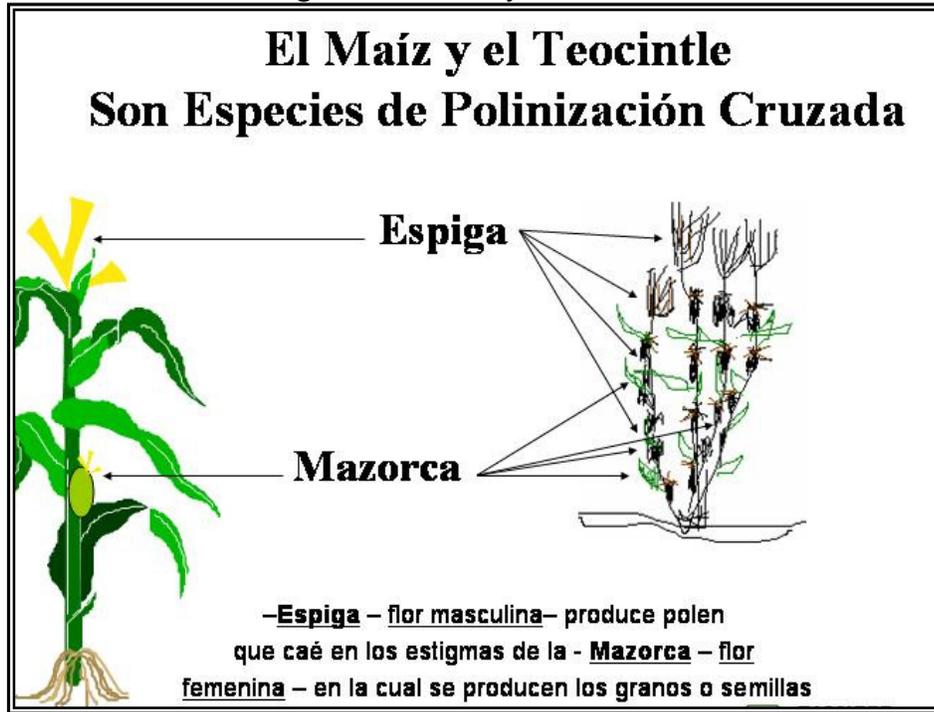


Figura 6. Granos en Cruzas Recíprocas Maíz y el Teocintle.

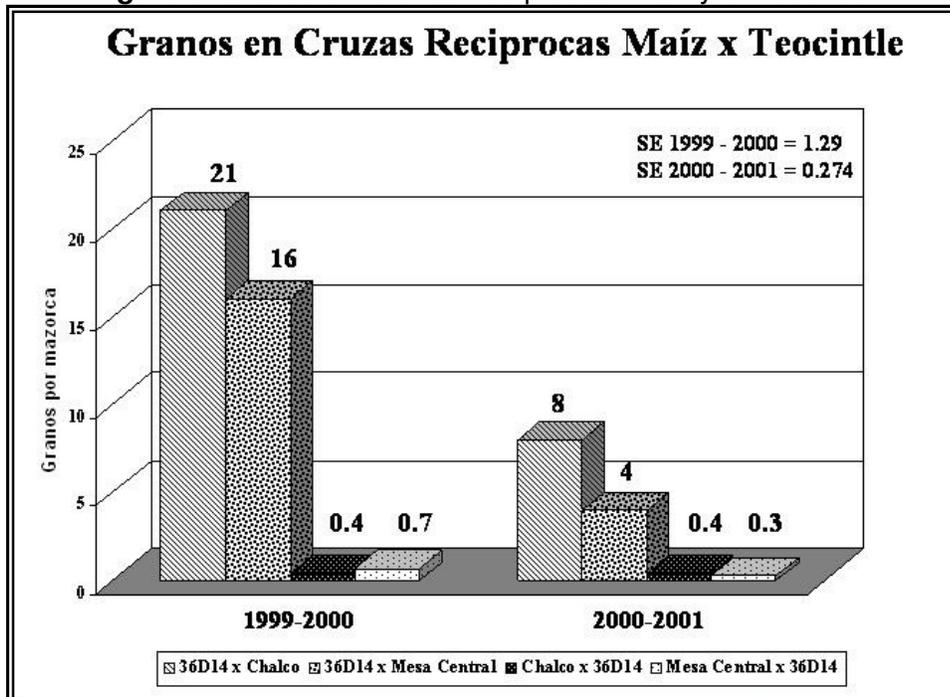


Figura 7. Longevidad y crecimiento de los Estigmas.

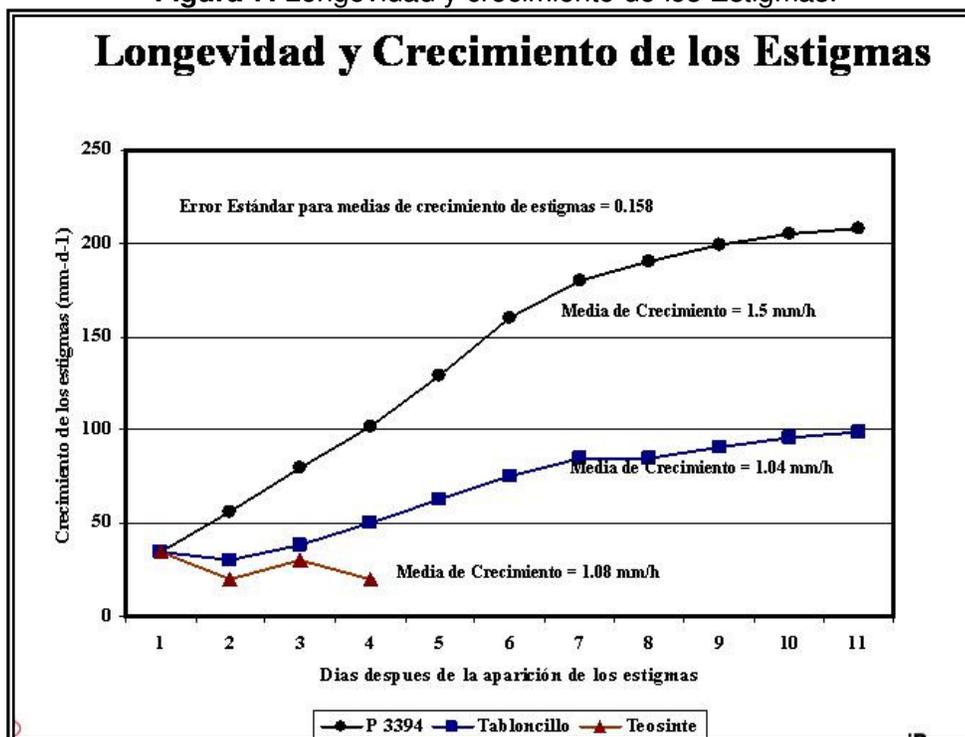


Figura 8. Morfología comparativa del Teocintle.

**Teocintle Tiene Espigas y Granos de Polén más Pequeños pero Produce más Polén que Maíz**

Genotipo	Ramas por Espiga	Espigas por planta	Espiguillas por Espiga	Peso de Espiga gr	Tamaño de Espiga cm	Días a Floración	
						50% Estigmas	50% Crecimiento
Teocintle	11	48	3921	0.5-5	23	54	55
Tuxpeño	32	1	2762	20	32	84	82
Tabloncillo	12	1	817	8	28	59	57
Zapalote Chico	17	1	1034	8	23	54	52
Bolita	14	1	786	9	31	58	56
Celaya	22	1	1823	13	31	72	70
Palomero Toluqueño	10	1	1639	11	30	70	68
Jala	37	1	2688	22	30	82	79
Conico	5	1	1026	10	26	61	59
POP 21	21	1	1443	11	29	74	74
POP 502	16	1	1263	10	28	72	71
POP 902	11	1	836	8	27	58	56
P3394 (híbrido)	6	1	769	5	32	64	66

En 1998 y después de 34 experimentos en México, las pruebas de Maíz GM fueron suspendidas; por tal razón el evento de maíz DAS-01507-1 no se ha establecido en territorio nacional.

Sin embargo estudios realizados en México han demostrado que el aislamiento en espacio requiere que los lotes contiguos se siembren a una distancia de la fuente de polen de aproximadamente 300 metros (Luna et al. 2001). Los experimentos aquí descritos se sembrarán a una distancia de por lo menos 300 metros con respecto a cualquier otro maíz; alternativamente se manejarán fechas de siembra para evitar que haya coincidencia entre el macho y la hembra. En ciclos subsecuentes se monitoreará por presencia de plantas voluntarias de maíz GM y serán destruidas.

En los estudios de flujo genético realizados por el ICA (Colombia), en Córdoba 2006, se verificó que la mayor parte del cruzamiento ocurrió en los primeros 50 m a partir de la fuente de polen, siendo estos resultados consistentes con lo encontrado en otros países donde se ha evaluado el flujo de polen de maíz, bien sea genéticamente modificado o convencional, el viento deposita el polen en mayor porcentaje a 25-50m de la fuente por lo que no se considera que genere contaminación mas allá de lo normal sobre cualquier otro tipo de maíz incluyendo materiales silvestres que se pudiesen encontrar en la vecindad (Resolución ICA 464/07. **(Anexo VI)**).

En recientes estudios, realizados en Europa, se sugiere una distancia de aislamiento de maíz modificado con maíz convencional de 20 metros para maíz destinado a ensilaje y 50 metros para maíz destinado a grano (Sanvido et al, 2008)

#### **i) Bibliografía reciente de referencia a los datos presentados**

Andow, D.A. and C. Zwahlen. 2006. Assessing environmental risks of transgenic plants. Ecology letters 9:196-214

Aylor, D.E. 2004. Survival of maize (*Zea mays*) pollen exposed in the atmosphere . *Agricult Forest Meteor* 119:111-129

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

Ortiz-García, S., Ezcurra, E. B., Shoel, B., Acevedo, F., Soberón, J., and Snow, A. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003-2004). *PNAS* 102:12338-12343

Sanvido, O., Widmer, F., Winzeler, M., Streit, B., Szerencsits, E. and Bigler, F. 2008. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Res.* 17:317-335.

#### **j) Las demás que establezcan las NOM**

### **IV. Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad y de bioseguridad a llevar a cabo (Ver anexo VII)**

#### **a) Medidas y procedimientos de monitoreo de la actividad:**

##### **1. Plan de monitoreo detallado**

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

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

Con el fin de que las autoridades correspondientes a la Verificación e Inspección puedan monitorear el movimiento de semilla y el establecimiento de los experimentos, se informará con 10 días hábiles de anticipación la fecha de las siguientes actividades a realizar en el manejo de los experimentos:

- Fecha de importación de la semilla.
- Fecha estimada y real de siembra.
- Fecha de la realización de las principales prácticas culturales en el manejo del cultivo.
- Fecha estimada y real de cosecha.
- Fecha de exportación del producto cosechado.
- Entre otras que la SAGARPA, el SENASICA, la DGSV, la SEMARNAT, el INE, y la CIBIOGEM consideren convenientes.

Se contará a su vez con los siguientes registros:

- Registro de Acción Correctiva
- Registro de Aislamiento Espacial
- Registro de Cosecha/Terminación
- Registro de Destrucción Temprana de la Cosecha
- Registro de Inspección e Inventario
- Registro de Inspección Poscosecha
- Registro de Retiro de Inflorescencia
- Registro de Siembra
- Registro de Transporte
- Registro del Bordo de Aislamiento

Ver el Manual de Buenas Prácticas de Siembra. Manejo del riesgo (**Anexo VII**).

Los Puntos Críticos de Control hasta ahora identificados dentro del plan de monitoreo son los siguientes:

1. Controlar el movimiento del material vegetal desde y hacia el sitio del ensayo (transporte y limpieza de cualquier maquinaria utilizada);
2. Controlar el almacenamiento de semillas y otro material vegetal;
3. Controlar la disposición del material vegetal residual o en exceso en el sitio de ensayo – puede tratarse del exceso de material de siembra, material remanente después de la cosecha y material de las actividades de limpieza, emasculación o desfloración;
4. Controlar la disposición de cualquier material retenido después de la cosecha, como es el caso de las semillas que se reservan para análisis subsiguientes;
5. Controlar la cosecha indebida en el lugar del ensayo; y
6. Realizar un programa de monitoreo para verificar que no se presente dispersión del OGM.

Al igual que en programas de calidad para otras cuestiones se requiere la implementación de procesos de control y documentación efectivos con el respaldo de procedimientos de inspección y verificación.

La detección del OGM será realizada a través del protocolo mencionado en el inciso (g) del apartado III

#### **b) Medidas y procedimientos de bioseguridad**

- 1. Medidas y procedimientos para prevenir la liberación y dispersión del OGM fuera de la zona o zonas donde se pretende realizar la liberación.**
- 2. Medidas y procedimientos para disminuir el acceso de organismos vectores de dispersión o de personas que no se encuentren autorizadas para ingresar al área de liberación a dichas zona o zonas**

#### **Ver el Manual de Buenas Prácticas de Siembra. Manejo del riesgo (Anexo VII).**

El personal debe conocer sus responsabilidades para garantizar que el material sea manipulado, empacado, etiquetado y almacenado de manera adecuada; que se lleven registros apropiados; y que en el caso de una liberación accidental se sepa qué acciones tomar y por parte de quién. Las copias de los procedimientos operativos normalizados deben encontrarse en forma accesible para todo el personal autorizado

Las áreas de almacenaje serán etiquetadas mencionando que contienen material vegetal experimental genéticamente modificado. Las etiquetas deben adherirse a los contenedores en el lugar de entrada, recomendándose que el acceso a los depósitos se restrinja sólo al personal autorizado.

#### Aislamiento espacial

Los ensayos a campo con organismos vegetales genéticamente modificados pueden aislarse reproductivamente de otras plantas de la misma especie o de parientes sexualmente compatibles separándolos con una distancia mínima. En esta fase experimental de siembra de maíz genéticamente modificado se propone como medida de bioseguridad para el no desespigue de las parcelas el aislamiento por distancia, esto con fundamento en estudios de flujo de polen realizados en México con híbridos convencionales no transgénicos, los cuales han demostrado que el aislamiento espacial para lotes contiguos de maíz se puede obtener a una distancia de la fuente de polen de aproximadamente 300 metros (Luna et al. 2001).

Los experimentos aquí descritos se sembrarán utilizando como medida de bioseguridad el aislamiento por distancia de entre 300 y 500 metros con respecto a cualquier otro maíz en base a las recomendaciones establecidas por la CONABIO (S.G.P.A./DGIRA.DDT.0191.06; S.G.P.A./DGIRA.DDT.0192.06; .G.P.A./DGIRA.DDT.0193.06; S.G.P.A./DGIRA.DDT.0194.06), alternativamente se manejarán fechas de siembra para obtener el aislamiento mediante desfases en la época de floración de los materiales de prueba con cualquier material que se pudiere encontrar a sus alrededores en la mencionada distancia.

Todas las plantas de la misma especie o de especies relacionadas presentes en la zona de aislamiento deben ser removidas antes de la antesis o de la formación de la semilla y tratarse de manera tal que resulten inviables.

#### Aislamiento temporal

Bajo ciertas condiciones ambientales, el aislamiento reproductivo de los lugares en los que se realizan los ensayos puede lograrse mediante el aislamiento temporal. Ello requiere escalonar la siembra del ensayo para que la liberación del polen se haya completado totalmente antes o después de la liberación del polen correspondiente de cualquier planta de la misma especie que pueda

haberse cultivado dentro de la zona de aislamiento reproductivo

### **3. Medidas para la erradicación del OGM en zonas distintas a las permitidas**

En caso de presentarse diseminación o dispersión no intencional de la semilla en sitios no permitidos para la liberación, se notificará inmediatamente a las autoridades de SENASICA-SAGARPA. Se delimitará y señalizará el área en donde ocurrió la liberación no intencional y ésta será controlada de acuerdo con las recomendaciones propias de la empresa, de SENASICA-SAGARPA y de la PROFEPA – INE - SEMARNAT.

#### Acciones correctivas.

Liberación accidental durante el transporte.

Si por accidente durante el transporte se rompen las cajas o sobres y se dispersa la semilla de maíz GM, inmediatamente se procederá a la recolección del material. Asimismo, se identificará plenamente el sitio del accidente y se establecerá un programa de monitoreo por un período de un año a fin identificar plántulas provenientes de maíz GM y se procederá a su destrucción inmediata por métodos mecánicos o químicos.

Liberación accidental durante la siembra.

Si por accidente se realiza la liberación en un sitio no autorizado, se reportará el incidente inmediatamente a la autoridad. Una vez confirmado que la liberación se ha realizado en sitios no autorizados se deberá recuperar tanto la semilla no germinada como el material vegetal. Se identificará claramente el área del accidente y se aplicará sobre la superficie involucrada un programa de monitoreo por un año y se procederá a la destrucción inmediata de plántulas mediante métodos mecánicos o químicos. Una vez que se han establecido las medidas correctivas de la fase de emergencia, se realizará una revisión para identificar las causas e instituir los cambios necesarios en las prácticas de manejo o entrenamiento adicional en el personal a fin de evitar que se repita la situación.

Medidas en caso de una liberación accidental.

Para detectar la dispersión no intencional del OGM más allá de los sitios de liberación permitidos o de las áreas designadas para su uso, se realizarán de manera rutinaria las siguientes acciones:

- El resto de la superficie cultivada con maíz en la región, será también inspeccionada de manera aleatoria mediante el análisis de plantas con tiras reactivas específicas para detectar la proteína Cry1F en maíz y así poder identificar siembras irregulares o ilegales de maíz GM. Al ser confirmada la siembra irregular o ilegal, se procede a la integración del expediente conforme a la ley y se establecerá un curso legal sobre quien resulte responsable, además de informar de tal situación a las autoridades de la SAGARPA.

### **4. Medidas para el aislamiento de la zona donde se pretenda liberar experimentalmente al OGM**

Ver inciso (b) de este apartado IV

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

Justificación en inciso (f) apartado III

**6. Métodos de limpieza o disposición final de los residuos de liberación**

Disposición final del OGM.

La semilla GM producida de estos experimentos y la semilla remanente que resulte de la limpieza o acondicionamiento se destruirá por incineración dentro de los terrenos del INIFAP. No se permitirá que ninguna semilla entre en la cadena alimenticia o se use como alimento para animales. Los residuos de rastrojo se incorporarán al suelo. Los terrenos donde se siembre el experimento se monitoreara para detectar la presencia de plantas voluntarias y de encontrarse se destruirán por medios mecánicos o químicos.

Limpieza del equipo de campo.

Antes de entrar al lugar del ensayo, el equipo utilizado para sembrar o plantar ensayos de campo confinados debe dejarse limpio de todo material vegetal, incluyendo semillas y cualquier material que pudiera haber quedado como consecuencia de las tareas realizadas con anterioridad. Igualmente, todos los equipos utilizados para sembrar o plantar el ensayo o los utilizados en las prácticas culturales deben ser limpiados en el lugar del ensayo para eliminar el traslado accidental y la liberación no intencional de material experimental. Los métodos de limpieza pueden incluir limpieza manual, con aire comprimido o con agua a alta presión.

También es importante que el personal que trabaja dentro del lugar del ensayo se asegure antes de salir del lugar que sus ropas y calzado estén limpios de semillas, polen u otro material vegetal.

El material vegetal residual proveniente del proceso de limpieza del equipo empleado en el ensayo, debe someterse a tratamientos que lo hagan inviable; se puede emplear calor seco o de vapor, la trituración, la incineración o el tratamiento con herbicidas y/o compuestos químicos debidamente etiquetados. Aunque puede ser aceptable transportar material desde el sitio del ensayo para su destrucción fuera del mismo (por ejemplo, autoclave en un laboratorio), se recomendara que el material sea eliminado en el mismo lugar en que se realiza el ensayo para limitar la posibilidad de una liberación accidental.

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

**a) Descripción de la zona donde se realizó la liberación**

La información sobre el uso del evento MON-00603-6 en otros países se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**b) Efectos de la liberación sobre la flora y fauna**

Ninguno

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

La información referente a estudios de riesgo del evento MON-0063-03-6 se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

Dicho evento ha sido comercializado por varios años sin haber presentado ningún problema hasta la fecha.

**d) Otros estudios o consideraciones en los que se analicen la contribución del OGM a solución de problemas ambientales, sociales, productivos, etc, así como consideraciones socioeconómicas que existan respecto a la liberación de OGMs al ambiente**

La agricultura intensiva en general ha sido una actividad que ha causado más problemas a la biodiversidad en los agroecosistemas modernos. En general a mayor intensificación de las labores agrícolas se han encontrado mayores reducciones en biodiversidad en estos ecosistemas (Ammann, 2005).

El establecimiento de maíz GM en los campos agrícolas favorecen las labores de conservación. Este tipo de prácticas no solo reduce el uso de combustibles fósiles al realizar menos labores de labranza (con la consiguiente disminución de emisiones de contaminantes en el aire), si no también reduce ampliamente la erosión del suelo por viento y flujo de agua a la vez de beneficiar la fertilidad del suelo. Las labores de conservación también disminuyen la degradación del suelo y además reduce la lixiviación de productos agrícolas, al mismo tiempo reducen la necesidad de fertilizante y agua de irrigación con lo cual se incrementa la limpieza y seguridad del agua de ríos, corrientes y pozos.

Se prevé que mediante el uso de esta tecnología se reducirá el uso de productos químicos ayudando a la protección del medio ambiente y a aumentar la seguridad de los trabajadores de campo en México.

Mayor información sobre el impacto del evento MON-00603-6 se encuentra en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

**e) En caso de importación, copia legalizada o apostillada de las autorizaciones o documentación oficial que acredite que el OGM esta permitido conforme a la legislación del país de origen, al menos para su liberación experimental traducida al español. La Secretaria competente, de considerarlo necesario, podrá requerir copia**

**simple de la legislación aplicable vigente en el país de exportación traducida al español.**

Información y documentos sobre las aprobaciones de liberación del evento MON-00603-6 se encuentran en el compendio de información que la empresa Monsanto ha presentado a las secretarías competentes para el evento NK603 y al cual se ha dado autorización de acceso por dichas autoridades de acuerdo al oficio presentado en el anexo VIII

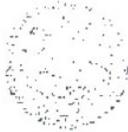
**VI. Consideraciones sobre los riesgos de las alternativas tecnológicas con que se cuente para contender con el problema para el cual se construyó el OGM en caso de que tales alternativas existan**

El establecimiento de maíz GM en los campos agrícolas favorecen las labores de conservación. Este tipo de prácticas no solo reduce el uso de combustibles fósiles al realizar menos labores de labranza (con la consiguiente disminución de emisiones de contaminantes en el aire), si no también reduce ampliamente la erosión del suelo por viento y flujo de agua a la vez de beneficiar la fertilidad del suelo. Las labores de conservación también disminuyen la degradación del suelo y además reduce la lixiviación de productos agrícolas, al mismo tiempo reducen la necesidad de fertilizante y agua de irrigación con lo cual se incrementa la limpieza y seguridad del agua de ríos, corrientes y pozos.

Se prevé que mediante el uso de esta tecnología se reducirá el uso de productos químicos ayudando a la protección del medio ambiente y a aumentar la seguridad de los trabajadores de campo.

**VII. Número de autorización expedida por salud cuando el OGM tenga finalidades de salud pública o se destine a la biorremediación. (Información confidencial)**

La autorización para uso del evento MON-00603-6 para consumo humano se encuentra a continuación, con número S00/L02/DNS/023406754/02 y fecha del 7 de junio de 2002.



SECRETARÍA  
DE SALUD

Dr. Juan Manuel De la Fuente Martínez  
Especialista Regulatorio  
Monsanto Comercial S.A. de C.V.  
Bosque de Duraznos 61, 3er Piso  
Col. Bosques de las Lomas  
11700, México, D.F.

COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA  
RIESGOS SANITARIOS  
DIRECCIÓN GENERAL DE CONTROL SANITARIO  
DE PRODUCTOS Y SERVICIOS  
DIRECCIÓN DE NORMALIZACIÓN SANITARIA  
S00/L02/DNS/ 023406754 /02  
México D.F., a

07 JUN 2002

En seguimiento a la solicitud de introducción de granos de maíz (*Zea mays* L.) modificado genéticamente para resistir al herbicida glifosato, línea NK603, también denominado maíz Roundup Ready<sup>®</sup> NK603, que expresa la proteína CP4 EPSPS, de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 y CP4 EPSPS L214P, de *Agrobacterium* sp. cepa CP4, para la elaboración de alimentos para consumo humano, le notifico lo siguiente:

Con base a la evaluación que esta Dirección General realizó de la información presentada e identificada con los números de entrada 013405548, 023405715, 023405720, 023405732, y 023405754 no se observa inconveniente en comercializar granos de maíz Roundup Ready<sup>®</sup> NK603, únicamente como materia prima para la industria de alimentos para consumo humano. Sin embargo, cada vez que se introduzca al mercado nacional, debe notificar a esta Dirección General la cantidad y el destino final de este cereal.

Es necesario señalar que independientemente de que se trate de un producto biotecnológico, debe cumplir con la regulación que se tiene para las especies de maíz convencionales para consumo humano.

Este producto está sujeto a la vigilancia de esta Dirección General así como también de otras dependencias que tengan ámbito de competencia en la materia. En el supuesto de que en el futuro se identifiquen problemas relacionados con la salud humana, la autoridad se reserva las facultades que las leyes le otorgan para intervenir en su oportunidad.

En virtud de que el maíz en México tiene impacto en otros ámbitos, es indispensable que solicite la autorización de las dependencias que tienen competencia en la materia.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
La Dirección General

Biól. Andra Arduane Piña  
Ccp. Lic. Egonst Enriquez Rubio, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios - Leibnitz No. 20, PH, Co. Anzures, 11590 México D.F.  
Ccp. Dr. Carlos Santos Burgoa, Director General de Salud Ambiental - Manano Escobedo No. 356, Col. Anzures, 11570, México, D.F.  
Ccp. Dr. Jorge Hernández Baeza, Director General de Sanidad Vegetal - Guillermo Pérez Valenzuela No. 127, Col. Del Carmen Coyoacán, 04100, México D.F.  
MAGDSCIF-DC

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

La vigencia esperada de liberación experimental se estima de una año, lo cual dará margen a realizar las pruebas de campo experimentales correspondientes y reportar los resultados inmediatamente después del análisis de estos.

**IX. La información que en cada caso determinen las NOM**

**ANEXO I. Opinión of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms**

**Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from herbicide-tolerant genetically modified maize NK603, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 by Monsanto<sup>1</sup>  
(QUESTION No EFSA-Q-2003-002)**

**Opinion adopted on 25 November 2003**

**SUMMARY**

This document provides an opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms (GMO Panel) of the European Food Safety Authority (EFSA) on genetically modified maize NK603 and derived food and feed products. The opinion is based on two questions raised by the Commission related to applications for the placing of the maize on the market by Monsanto under the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 and the Directive 2001/18/EC on the deliberate release of genetically modified organisms (GMOs) into the environment (EC, 1997; EC, 2001).

In the first question, the GMO Panel was asked to consider the safety of foods and food ingredients derived from NK 603 maize and in the second question it was requested to consider whether there is any scientific reason to believe that the placing on the market of NK603 maize, for import and processing, is likely to cause any adverse effects on human health and the environment. The questions followed two separate scientific assessments which were initially made by the appropriate authorities in The Netherlands and Spain and subsequently evaluated by all other Member States. An assessment of the NK603 maize was requested by the Commission because of questions raised by several Member States following the evaluations at national level. When this is the case, EU legislation requires that EFSA carries out a further assessment and provides an opinion.

In delivering its opinion the Panel considered the applications and additional information provided by the applicant and the specific questions and concerns raised by the Member States. At the request of the Commission, the Panel has provided two separate opinions. However, as both dossiers cover to a large extent the same issues a single risk assessment is provided for both opinions.

The risk assessment process was conducted using scientific guidance published by the EC Scientific Committees (EC, 2003). It included examination of the DNA integrated into NK603 using particle bombardment, the nature and safety of the target proteins produced by the transgenic event and the possibility that the genetic modification may have influenced the safety (including allergenicity) and the nutritional value of NK603 in comparison with conventional maize.

---

<sup>1</sup> For citation purposes: Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from herbicide-tolerant genetically modified maize NK603, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 by Monsanto, *The EFSA Journal* (2003) 9, 1-14.

The NK603 maize has been genetically modified to provide tolerance to the herbicide glyphosate. The stated purpose of the modification is to allow farmers to manage weeds more effectively in maize fields during cultivation. NK603 maize has been planted for field studies within the EU and has been marketed in several countries outside the EU. The present applications concern only import and processing, but not cultivation of the maize. If approved it would therefore make it possible to place on the market NK603 maize and derived products, such as starch, oil, maize gluten feed and maize meal for food and feed use, whereas the crop would be grown and harvested outside the EU.

Glyphosate tolerance was achieved by the introduction of a gene encoding glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4 (CP4 EPSPS). The EPSPS activity is needed for the biosynthesis of aromatic amino acids in plants and in micro-organisms but the structure of the plant enzyme makes it commonly vulnerable to glyphosate, thereby causing the plants to be killed by the herbicide.

Molecular analysis showed that NK603 contains a single inserted copy of the DNA present in the construct used for the transformation. The plasmid vector contains two adjacent plant gene expression cassettes each containing a single copy of the *cp4 epsps* gene. The insert in NK603 does include some molecular re-arrangements at one end of the insert and also includes a fragment of chloroplast DNA. These re-arrangements and the insertion of chloroplast DNA do not lead to new traits and are not considered to pose a safety risk. In the unlikely event that a new peptide or protein is produced as a consequence of the insertion event, bioinformatics analysis showed that these would have no homology to known toxins or allergens.

As a result of the genetic modification NK603 contains two slightly different CP4 EPSPS proteins expressed from two copies of the *cp4 epsps* gene using different promoters. The proteins differ from each other in one amino acid. Analysis of the impact of this change indicated no apparent changes in EPSPS protein structure, activity, toxicity or allergenicity using appropriate bioinformatics approaches, *in vitro* digestion procedures and studies on experimental animals. Furthermore, appropriate animal feeding trials indicated that NK603 was as safe as its non-GM comparator. Analysis of the grain from field trials in the USA and Europe showed that NK603 had the same composition as its non-GM comparator.

The notification C/ES/00/01 for maize NK603 only concerns import. There is therefore no requirement for scientific information on possible environmental effects associated with the cultivation of maize NK603. The GMO Panel agrees with the conclusions of the environmental risk assessment by the applicant that the likelihood of unintended environmental effects due to the adventitious release and spread of NK603 maize will not be different from that of traditionally bred maize. The monitoring plan provided by the applicant is in line with the intended uses for the GMO.

In conclusion, the Panel has considered all the evidence provided and is of the opinion that NK603 maize is as safe as conventional maize and therefore the placing on the market of NK603 maize for food or feed or processing is unlikely to have an adverse effect on human or animal health or, in that context, on the environment.

**Key words:** GMOs, maize NK603, herbicide tolerance, glyphosate, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), food safety, feed safety, human health, environment, import, Regulation (EC) 258/97, Directive 2001/18/EC.

## TABLE OF CONTENTS

<b>BACKGROUND</b>	<b>3</b>
<b>TERMS OF REFERENCE</b>	<b>4</b>
<b>ASSESSMENT</b>	<b>4</b>
1. MOLECULAR CHARACTERISATION	4
2. COMPARATIVE ANALYSIS	6
3. ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT AND MONITORING PLAN	7
4. FOOD/FEED SAFETY ASSESSMENT	8
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>10</b>
<b>DOCUMENTATION PROVIDED TO EFSA</b>	<b>11</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>12</b>
<b>SCIENTIFIC PANEL MEMBERS</b>	<b>14</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENT</b>	<b>14</b>

## BACKGROUND

In April 2001, Monsanto submitted a request under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97<sup>2</sup> to the Dutch authorities for placing on the market foods and food ingredients derived from glyphosate-tolerant GM maize NK603.

On 5th November 2002, the Dutch authorities forwarded to the Commission its initial assessment report of the product concerned carried out by the Gezondheidsraad (NL), which had reached the conclusion that foods and food ingredients derived from maize NK603 are as safe as foods and food ingredients produced from “conventional” maize and may be used in the same manner.

In accordance with Article 6(4) of the Novel Food Regulation 258/97, the Commission forwarded the initial assessment report to the Member States on 6 January 2003. The Member States submitted their comments and/or presented reasoned objections within the 60 day period provided for in the authorisation procedure. In consequence, a Community Decision will be required and beforehand, the Commission has requested a scientific opinion of the European Food Safety Authority (EFSA) as there might be an effect on public health (Article 11 of Regulation (EC) No 258/97).

### Community interest

Following the notification of the initial assessment report of the product concerned, the Member States presented their submissions and it emerged that views differed on this issue. Several Member States supported the conclusion of the initial assessment report carried out by the Dutch authorities. However, some Member States were opposed to this conclusion, raising scientific concerns with regard to the risk assessment and/or claiming lack of relevant data. Other Member States had based their objections on non-scientific arguments.

---

<sup>2</sup> Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients.

In view of divergent opinions of the Member States and the Community interest in this matter, the European Commission has decided to seek the opinion of the European Food Safety Authority.

In cases where the placing on the market in the EU is likely to have an effect on public health, consultation of the Scientific Committee on food (now the European Food Safety Authority) is obligatory (article 11 of Regulation (EC) No 258/97).

## TERMS OF REFERENCE

In accordance with Article 29 (1) (a) of Regulation (EC) No 178/2002<sup>3</sup> (EC, 2002), the European Commission requests the European Food Safety Authority to issue a scientific opinion on the use of glyphosate-tolerant genetically modified (GM) maize NK603 or products derived from it as foods or food ingredients in the context of Regulation (EC) No 258/97 within 3 months and at the latest by the end of November 2003. EFSA is asked to specify whether the authorisation of foods and food ingredients derived from NK603 is likely to have an effect on public health.

In particular, EFSA is requested to focus on the elements of a scientific nature in the comments/objections raised by the Member States to the Initial Assessment Report.

EFSA is not requested to give an opinion on the non-scientific objections raised by Member States, in the context of the entry into force of forthcoming legislation or requests for further legislative/implementing measures.

## ASSESSMENT

### 1. Molecular characterisation

#### 1.1 The transformation process and vector constructs

Maize line AW x CW, used in the initial transformation, is a proprietary maize cell culture, which was transformed using particle acceleration technology to develop the NK603 maize event. Embryogenic maize cells of AW x CW were, therefore, the initial recipient of the introduced DNA. Conventional breeding methods were used to backcross plants generated from the initial transformation into a recurrent, desired inbred maize line with a genetic background of interest to the breeder.

NK603 has been developed for tolerance to glyphosate by the introduction of a gene coding for glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Agrobacterium* sp. strain CP4 (CP4 EPSPS). Particle acceleration was used to introduce a fragment of DNA

---

<sup>3</sup> Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety.

isolated from the bacterial plasmid vector PV-ZMGT32. The plasmid vector contains two adjacent plant gene expression cassettes each containing a single copy of the *cp4 epsps* gene fused to chloroplast transit peptide (CTP) sequences based on sequences derived from *Arabidopsis thaliana* EPSPS. CTP targets the CP4 EPSPS protein to its natural sub cellular location in the chloroplast. In the first *ctp2-cp4 epsps* cassette the coding sequence is regulated by the rice actin promoter and a rice intron sequence introduced upstream of the CTP sequence. Expression of the second *ctp2-cp4 epsps* cassette is regulated by an enhanced 35S CaMV promoter and a maize intron derived from a gene encoding a heat shock protein. In each cassette the *cp4 epsps* sequence is linked to the nopaline synthase terminator (NOS 3') sequence from *Agrobacterium tumefaciens*. The vector also contains an *nptII* bacterial selectable marker gene (for kanamycin resistance; derived from the prokaryotic transposon *Tn5*) and an origin of replication (*ori*). A *MluI* restriction fragment of the PV-ZMGT32 plasmid vector, designated PV-ZMGT32L, was used for transformation and this fragment only contains the *cp4 epsps* plant gene expression cassettes. The *nptII* gene as well as the *ori* are not present in the fragment PV-ZMGT32L.

### **Use of the 35S CaMV promoter**

The 35S CaMV promoter is derived from the common cauliflower mosaic virus (CaMV) and is a promoter frequently used in the genetic modification of (crop) plants. It has been suggested (Ho et al., 1999) that the 35S CaMV promoter could result in an inadvertent activation of plant genes or endogenous viruses, promote horizontal gene transfer, or might even recombine with mammalian viruses with unexpected consequences. The UK Advisory Committee on Releases of GM crops into the Environment has considered the 35S CaMV promoter issue (ACRE, 2002) and concluded that no new data or direct experimental evidence has been presented to support the hypothesis that the promoter is inherently unsafe. Moreover, the Committee emphasized that humans and animals have been eating plant material containing the 35S promoter via natural CaMV infection and no adverse effects have been reported. The Panel concurs with ACRE's comments. Additional arguments for the safety of the promoter in GM crops are provided by Hull et al. (2000).

### **1.2 Transgenic constructs in the genetically modified plant**

The molecular characterisation of NK603 showed that both *ctp2-cp4 epsps* gene cassettes are intact within NK603. The sequence of the *cp4 epsps* gene from the first cassette is identical in NK603 to that in the original plasmid, whilst in the second inserted cassette the sequence of the *cp4 epsps* gene differs by 2 nucleotides from that in the original plasmid (due to this difference the gene is designated *cp4 epsps* L214P). These nucleotide changes result in one silent mutation and one amino acid substitution of proline for leucine at amino acid position 214.

Southern blotting and PCR have been used to provide data on inserts within the derived GM line NK603. The analysis included the use of appropriate restriction endonucleases and showed that the insert is a single complete copy of PV-ZMGT32L. There is no detectable presence of plasmid DNA from outside of the left and right borders of plasmid vector PV-TMGT32L. The insert also includes an inversely linked 217 bp DNA fragment of the enhancer region of the rice actin promoter (at the 3' end). This fragment does not contain sequences needed for promoter activity. Next to this 217 bp fragment is a 305 bp region with homology to chloroplast DNA. Both 3' and 5' ends of the insert were confirmed by PCR and DNA sequencing and the sequences flanking the insert are confirmed as belonging to the maize genome. Sequences of 307 and 497 bp were provided, respectively, for the 5' and 3' flanking regions of the NK603 genome.

Some Member States have asked for additional experimental data on the presence or absence of additional chloroplast or mitochondrial DNA in the nuclear DNA of NK 603 maize. Multiple

independent gene transfers from the mitochondria and chloroplasts to the nuclear genome have been reported in the scientific literature. Functional gene establishment of organellar DNA in the nucleus is rare, but DNA transfer without functionality is presumed to be more frequent. For example, in tobacco DNA is transferred from the chloroplast and integrated into the nucleus at a frequency of one in approximately 16,000 pollen grains (Huang et al., 2003; minimum estimate). Indeed, long tracts of organellar DNA are found in the eukaryotic chromosomes of plants. For example, about 620 kb of mitochondrial DNA has been found on chromosome 2 of *Arabidopsis*, and about 33 kb of chloroplast DNA on chromosome 10L of rice. Furthermore, eukaryotes generally contain DNA sequences in their nuclear genome that show close similarity to organellar DNA, suggesting that transfer of chloroplast and mitochondrial DNA are ongoing processes. The Panel is of the opinion that there is no reason to suggest that any genes and gene products of maize organelles in NK603 maize carry any increased risk potential compared with the organellar genes in the non-GM comparator. Specifically for NK603, and concerning the chloroplast fragment inserted, the Panel considers that data provided from bioinformatic analysis and other safety studies address the issue of potential unintended effects caused by insertion of the fragment. The Panel concludes that insertion of the chloroplast fragment in NK603 does not constitute a risk.

Reverse transcriptase PCR analysis (RT PCR) was used to determine whether transcripts are produced which encompass the 3' end of the insert (which includes rice actin promoter sequences and chloroplast DNA fragments) and the adjacent 3' flanking region of maize genomic DNA. RT PCR did detect a transcription product which initiates within the NK603 insert (in the actin or 35S CaMV promoter regions) and which is processed through the NOS 3' terminator into the maize genome flanking 3' region. This could create 2 or more mRNA species, a smaller one at 1.4 kb (predicted as the *cp4 epsps L214p* transcript) and a larger species at >1.4kb (a product likely to be the result of incomplete termination at the NOS 3' genetic element due to "read through"). The RT PCR revealed that the larger fragment was a very small fraction of transcript produced from the *cp4 epsps L214p* insert. Transcription of the larger fragment was undetectable in Northern blots using probes based on elements downstream of NOS 3'. As predicted, the 1.4 kb element was detectable in Northern blots using a *cp4* gene probe.

"Read through" transcription is routinely observed in many plant genes. Furthermore, the RNA fragment observed in the product of the RT PCR amplification is not expected to have a regulatory function as described for micro RNAs which are short RNAs between 21 and 23 nt long derived from the processing of longer RNAs of around 70 nt (Jones, 2002). This is much shorter than the RNA fragments amplified from NK603.

### 1.3 Inheritance and stability of inserted DNA

Segregation data for nine generations of line NK603 have demonstrated the stability of the inserted DNA through six generations of crossing and three generations of self-pollination.

## 2. Comparative Analysis

### 2.1 Choice of the comparator

LH82 x B73 (sometimes abbreviated as "B73") maize can be considered to be an appropriate control hybrid for NK603 maize as it has a genetic background which is comparable to that of the NK603 event used in the molecular and compositional analyses, but lacks the genes

encoding the CP4 EPSPS proteins. The applicant confirms that LH82 x B73 is a non-GM control hybrid used in the molecular analyses of NK603 maize, as well as in the compositional analyses performed on material grown in the US and Europe. These analyses have been included in the application for NK603 maize. The flanking sequence research on NK603 maize, which made use of a B73 control line, has established that the flanking sequences of NK603 maize are related to the B73 non-GM control and are native to the maize genome. Thus B73 can be considered as an appropriate control line for comparative evaluations.

## 2.2 Field trials and compositional analysis

The material to be analysed in the comparative analysis was collected from field trials in the USA (year 1998) and Europe (year 1999). The US field trials in 1998 were conducted in Iowa, Illinois, Indiana, and Ohio (two replicated and six non-replicated trials). The field trials in Europe in 1999 were carried out in France and Italy (four replicated trials).

With the exception of the glyphosate-tolerance, NK603 maize is morphologically and agronomically similar to the non-GM comparator. With regard to compositional equivalence a total of 51 different parameters (proximate analysis, specific compounds and groups of compounds) were analysed including ash, carbohydrates, fibre, moisture, protein, total fat, amino- and fatty acids, minerals (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn), vitamin E, and trypsin inhibitor. The levels of different chemical constituents in NK603 maize were either within the range found for the non-transgenic controls or within the ranges reported in published literature. Statistical analysis of the results revealed one significant difference in 1998, for stearic acid in kernels. This difference was minor (NK603: 1.95%; control: 1.86%) and was not observed in 1999. The biological significance of differences was further evaluated by performing additional comparisons of the level of specified compounds in NK603 with the levels in either commercial non-GM maize lines grown in 1998 or two control lines grown in trials conducted in 1994-1995. No conclusive differences requiring further studies were found. Thus NK603 maize used for food, feed and processing can be considered to have the same composition as the genetically related non-GM maize lines for food and feed use.

## 3. Environmental Risk Assessment and Monitoring Plan

The notification C/ES/00/01 for maize NK603 under Directive 2001/18/EC<sup>4</sup> is for import only, and thus there is no requirement for scientific information on environmental effects associated with the cultivation of maize NK603. In the environmental risk assessment the applicant has indicated that maize is highly domesticated and is not able to survive in the environment without cultivation. Maize plants are not winter hardy, have lost their ability to release seeds from the cob, and do not occur outside cultivated land in Europe, despite cultivation for many years. In addition there are no cross compatible wild relatives in Europe, and gene flow via pollen is largely restricted to neighbouring crops. Maize is a hybrid crop so that imported seeds will be a segregated F2 generation and not as fit as F1. Studies in Europe and elsewhere with NK603 have not shown any enhanced weediness or fitness. The environmental risk assessment concludes that the likelihood for unintended environmental effects due to the establishment

---

<sup>4</sup> Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC.

and spread of NK603 maize will not be different from that of traditionally bred maize. The GMO Panel agrees with this assessment.

The objectives of a monitoring plan according to Annex VII of Directive 2001/18/EC are to (1) confirm that any assumption regarding the occurrence and impact of potential adverse effects of the GMO, or its use, in the environmental risk assessment are correct and (2) identify the occurrence of adverse effects of the GMO or its use on human health or the environment which were not anticipated in the environmental risk assessment. The scope of the monitoring plan provided by the applicant is in line with the intended uses for the GMO since the environmental risk assessment did not cover cultivation. The Panel advises that appropriate management systems should be in place to restrict seeds of maize NK603 entering cultivation, as the latter requires specific approval under Directive 2001/18/EC.

The Panel is not in a position to evaluate co-existence issues which relate to risk management and not risk assessment.

## 4. Food/Feed Safety Assessment

### 4.1 Toxicology

#### ***Safety of expressed novel proteins in maize NK603***

The EPSPS enzyme occurs in a wide range of plants, fungi and certain micro-organisms and thus humans have a long history of dietary exposure to the protein. No adverse effects associated with its intake have been identified. Previous applications for glyphosate resistant crops containing the CP4 EPSPS protein have been evaluated and found to be safe for human and/or animal consumption (SCP, 1998a, 1998b; ACNFP, 1994). The GMO Panel is of the opinion that no scientific data have emerged which call for a change of this opinion.

The NK603 maize expresses the CP4 EPSPS and CP4 EPSPS L214P variant enzymes in addition to the natural maize EPSPS enzyme. Proteins derived from the *cp4 epsps* and *cp4 epsps L214p* genes were shown to be structurally and functionally equivalent. Evidence provided included (1) modelling of CP4 EPSPS L214P protein structure (which showed that the amino acid substitution does not alter the predicted secondary and tertiary structure of the protein) (2) provision of evidence that the CP4 EPSPS protein domain containing the proline is highly variable in all known EPSPS proteins and (3) demonstration of equivalent enzyme activities for both CP4 EPSPS and CP4 EPSPS L214P proteins. Thus both proteins can be regarded as safe. Additional safety data were provided which included:

*In vitro digestibility.* Simulated gastric fluid (pH 1.2) containing pepsin and recombinant CP4 EPSPS or CP4 EPSPS L214P at 2.89:1 (w/w) ratio was incubated and analysed for intactness of the EPSPS proteins. More than 95-98% of the EPSPS protein was digested within 15 seconds. Intestinal digestion of CP4 EPSPS L214P was also simulated at a pancreatin: EPSPS ratio of 55:1 (w/w; buffer pH 7.5). Within four hours, more than 90% of the EPSPS was digested. These results confirm previous findings and show that the recombinant CP4 EPSPS enzymes were rapidly degraded in simulated gastric and intestinal fluid.

*Lack of homology of both CP4 EPSPS proteins to known toxic proteins.* The amino acid sequences of the CP4 EPSPS proteins were compared with the amino acid sequences of known toxic proteins using a bioinformatic approach based on computer algorithms. No relevant

similarities between the sequence of the CP4 EPSPS proteins and sequences of toxic proteins were found.

*Acute toxicity testing of both CP4 EPSPS proteins in mice.* CP4 EPSPS and CP4 EPSPS L214P proteins produced in *Escherichia coli*, genetically modified to harbour the same *ctp2-cp4 epsps* cassettes as maize NK603, were fed at high single doses to CD-1 mice in acute gavage studies. Other mice received suitable control material. No adverse effects were observed in animals dosed with the CP4 EPSPS proteins. The LD50 of CP4 EPSPS and CP4 EPSPS L214P, therefore, exceeds the highest doses administered, i.e. 572 mg/kg body weight and 817 mg/kg body weight, respectively. The Panel does not advocate this type of study with proteins that have a known history of safe human exposure. No differences were detected between the EPSPS proteins purified from NK603 maize and the equivalent proteins expressed in *E. coli*. The expressed proteins were correctly processed at the amino terminus (cleavage of leader) and they were not glycosylated.

#### **Safety of the whole GM food/feed**

*Sub-chronic (90-days) toxicity studies in rats fed maize NK603.* No consistent differences in the measured clinical, biochemical and histological parameters were noted for rats fed on non-GM or NK603 maize, except for slightly elevated levels of average corpuscular volume and average corpuscular haemoglobin in female rats administered with a high dose. Since both parameters were calculated from other data (hematocrit/red blood cells and haemoglobin concentration/red blood cells, respectively), and no other observations of treatment related effects were made, the applicant suggests that an artifactual difference resulted from a slightly higher hematocrit or haemoglobin concentration and slightly lower red blood cell count at these sampling points. Furthermore, the applicant concludes that these findings are of no biological significance. The Panel accepts this as a reasonable interpretation of the data. The Panel also found the doses chosen for the study (11% or 33% of diet) appropriate, as they did not distort the nutritional balance of the experimental animals. The standard rodent diet used by the test laboratory contains approximately 33% maize grain.

#### **4.2 Allergenicity**

Some Member States raised questions about the suitability of approaches used for allergenicity testing. These strategies concentrate on characterisation of the source of the recombinant protein, the potential of the newly expressed protein to induce *de novo* sensitisation, or to elicit allergic reactions in already sensitised persons, and whether the transformation may have altered the allergenic properties of the modified food. A weight of evidence approach is recommended, taking all information obtained with various test methods into account, since no single experimental method yields decisive evidence for allergenicity (EC, 2003; Codex Alimentarius Commission, 2003).

An allergy risk evaluation of CP4 EPSPS protein has been completed for previous applications evaluated by the EC Scientific Committees and the national competent authorities using the guidelines proposed by Metcalfe et al., 1996. These included absence of known allergenicity of the source, absence of sequence homology with known allergens and rapid and extensive degradation by proteolytic enzymes. The Panel is not aware of any new information on allergenicity which requires a change of this opinion. Nor is the Panel aware of any new tests which produce more relevant or accurate information on possible allergenicity of the protein and which provide a higher guarantee of safety.

Member States also raised the question of the possibility that new allergens might arise. The applicant has provided a bioinformatic analysis of potential allergenicity, as well as toxicity and

pharmacological activity, of putative peptides encoded at the 3' and 5' junctions of the NK603 event and plant genomic DNA. Sequences spanning the junction were translated from stop codon to stop codon in all frames and each frame compared to appropriate sequence databases including those for allergens and toxins. Data provided demonstrate that in the unlikely event that junction polypeptides were translated they would not share a sufficient degree of sequence similarity or identity to known allergens or toxins.

Another related issue is that allergenicity of the whole crop could be increased as an unintended effect of the random insertion of the transgene in the genome of the host e.g through qualitative or quantitative modifications of the pattern of expression of endogenous proteins. This issue does not appear relevant to the Panel since maize is not considered a major allergenic food and possible overexpression of any endogenous protein which is not known to be allergenic would be unlikely to alter the overall allergenicity of the whole plant.

#### **4.3 Nutritional Assessment of GM food/feed**

*Feeding studies on broilers.* A nutritional performance study with suitable dosages of maize NK603 grain and non-GM maize grain was carried out with rapidly growing broilers, which reach full size within approximately six weeks. The applicant states that the NK603 maize grain used in the 90-day toxicity study in rats and the 42-day broiler feeding study was obtained from plots treated with glyphosate herbicide. The maize grain used in the studies was analysed for residual herbicide content. The level of glyphosate in the NK603 grain was below the maximum residue level, as regulated under EU legislation on plant protection products.

The only statistically significant difference occurred between fat pad weights of broilers fed maize NK603 and broilers fed non-GM maize. The weights were 0.034 kg and 0.037 kg (1.5 % and 1.7 % of body weight), respectively. The difference is not considered to be of biological significance. The values are within the variability (0.024-0.063 kg) reported in the literature (Esteve-Garcia and Llaurodo, 1997; Kidd and Kerr, 1997; Lei and Van Beek, 1997; Smith et al., 1998; Farran et al., 2000; Peak et al., 2000). The Panel also wishes to point out the published data on feeding studies with maize NK603 and non-GM maize on Angus-continental cross steers and Holstein dairy cows (Erickson et al., 2003; Grant et al., 2003; Ipharraguerre et al., 2003). The data show that the nutritional value of NK603 is equivalent to its non-GM comparator.

#### **4.4 Residues and metabolites of the herbicide**

A Member State has raised the issue of the possible occurrence of residues of glyphosate and its metabolite (AMPA) in maize NK603, and the effects of these compounds on animal and human health. The Panel recognizes the importance of the issue and notes that the risk assessment of such compounds is within the scope of Directive 91/414/EEC<sup>5</sup> (EC, 1991).

## **CONCLUSIONS**

**In accordance with Article 29 (1) (a) of Regulation (EC) No 178/2002, the European Commission has requested the European Food Safety Authority to issue two scientific opinions as to whether the placing on the market of NK603 maize and derived food and feed products,**

---

<sup>5</sup> Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market.

for import and processing, is likely to cause any adverse effects on human health and the environment in the context of Regulation (EC) No 258/97 and Directive 2001/18/EC. The EFSA GMO Panel considered the information made available by the applicant as sufficient to evaluate the safety of NK603 maize and derived products, food and feed ingredients and to address all the specific questions raised by the Member States related to the risk assessment. Therefore additional experimental studies are not deemed necessary.

Maize NK603 has been developed for tolerance to glyphosate herbicide by the introduction of a glyphosate tolerant 5-enoylpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from *Agrobacterium* sp. The Panel has considered information provided on (1) the molecular inserts within the transgenic event, (2) the chemical composition of the GM and non-GM maize, (3) the safety of the proteins expressed and (4) the potential for risks associated with any changes to the toxicological, allergenic and nutritional properties of NK603. Having considered the evidence, the GMO Panel is of the opinion that NK603 maize is as safe as conventional maize and therefore the placing on the market of NK603 maize for food or feed or processing is unlikely to have an adverse effect on human and animal health and, in that context, the environment.

## DOCUMENTATION PROVIDED TO EFSA

### With regard to the application under Directive 2001/18/EC:

1. Letter, dated 7 August 2003 with ref. SANCO.D. MW/dj D(2003) 450049, from Mrs Jaana Husu Kallio from the Health & Consumer Protection Directorate-General requesting a consultation of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and following correspondence with EFSA (letter, dated 13 August 2003 with ref. MCM/D (2003) – 00255, from Mr. Geoffrey Podger and letters, dated 18 and 23 September 2003 with ref. SANCO.D.5 MW/ D(2003) 4500091 and SANCO.D.5 MW/ D(2003) 4500094, from Mrs Jaana Husu Kallio)
2. A letter from Monsanto to the competent authority of Spain concerning submission of the notification.
3. The report of the assessment of the notification carried out by the competent authority of Spain (Ministerio de Medio Ambiente).
4. The summary of the notification.
5. Roundup Ready maize line NK 603 – Application for consent to place on the market a genetically modified higher plant under Directive 2001/18/EC (Monsanto).
6. Additional information submitted by Monsanto in response to comments and objections raised by the competent authorities of Member States.
7. The objections maintained by Member States

### With regard to the application under Regulation 258/97:

1. Letter, dated 24 July 2003 with ref. SANCO AN/dlc-D(03)440360, from Mrs Paola Testori Coggi from the Health & Consumer Protection Directorate-General requesting a consultation of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and following correspondence with EFSA (letter, dated 5 August 2003 with ref. MCM/D (2003) – 00242,

- from Mr. Geoffrey Podger and letter, dated 27 August 2003 with ref. PD/ko/D440449 (2003), from Mrs. Paola Testori Coggi).
2. Roundup Ready maize line NK 603 – Application for approval under Regulation (EC) No. 258/97 concerning Novel Foods and Food Ingredients (Monsanto).
  3. Herbicide-tolerant maize (NK603) Assessment of safety for the consumer, in accordance with European Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients (Gezondheidsraad, NL).
  4. Member States' comments/objections.
  5. Reaction by Monsanto to the Member States' comments/objections.

## REFERENCES

- ACNFP, (1994) Annual Report 1994, Appendix 4, Advisory Committee on Novel Foods and Processes, London, UK.  
[http://www.foodstandards.gov.uk/multimedia/webpage/acnfp\\_report\\_1994](http://www.foodstandards.gov.uk/multimedia/webpage/acnfp_report_1994)
- ACRE, 2002. Advisory Committee on Releases of GM crops into the Environment. ACRE's response to concerns raised in written representations and submissions associated with the CHARDON LL public hearing and to statements made at ACRE's open hearing relating to the safety assessment of T25 GM maize conducted under Directive 90/220/EEC.  
<http://www.defra.gov.uk/environment/acre/advice/advice20c.htm>
- Codex Alimentarius Commission, 2003. Codex principles and guidelines on foods derived from biotechnology Foods Derived from Biotechnology. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organisation: Rome.  
<ftp://ftp.fao.org/codex/standard/en/CodexTextsBiotechFoods.pdf>
- EC, 1991. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Official Journal of the European Communities L230, 1-32.  
[http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sga\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=31991L0414&model=guichett](http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=31991L0414&model=guichett)
- EC, 1997. Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. Official Journal of the European Communities L43, 1-7.  
[http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sga\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=31997R0258&model=guichett](http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=31997R0258&model=guichett)
- EC, 2001. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Communities L106, 1-39.  
[http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2001/l\\_106/l\\_10620010417en00010038.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2001/l_106/l_10620010417en00010038.pdf)
- EC, 2002. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Official Journal of the European Communities L31, 1.2.2002, p. 1-24.

- [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l\\_031/l\\_03120020201en00010024.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l_031/l_03120020201en00010024.pdf)
- EC, 2003. Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed, prepared by the Joint Working Group on Novel Foods and GMOs, 6-7 March 2003. [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out327\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out327_en.pdf)
- Erickson, G.E., Robins, N.D., Simon, J.J., Berger, L.L., Klopfenstein, T.J., Stanisiewski, E.P. and Hartnell, G.F., 2003. Effect of feeding glyphosate-tolerant (Roundup –Ready events GA21 or nk603) corn compared with reference hybrids on feedlot steer performance and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.*, **81**, 2600-2608.
- Esteve-Garcia, E. and Llaurodo, L., 1997. Performance, breast meat yield, and abdominal fat deposition of male broiler chickens fed diets supplemented with DL-methionine or DL-methionine hydroxy analogue free acid. *Br. Poult. Sci.*, **38**, 397-404.
- Farran, M.T., Khalil, R.F., Uwayjan, M.G. and Ashkarian, V.M., 2000. Performance and carcass quality of commercial broiler strains. *J. Appl. Poult. Res.*, **9**, 252-257.
- Grant, R.J., Fanning, K.C., Kleinschmit, D., Stanisiewski, E.P. and Hartnell, G.F., 2003. Influence of glyphosate-tolerant (event nk603) and corn rootworm protected (event MON863) corn silage and grain on feed consumption and milk production in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, **86**, 1707-1715.
- Hull, R., Covey, S.N, Dale P.J., 2000. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **12**, 1-5.
- Huang, C.Y, Ayliffe M.A., Timmis, J.N., 2003. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature*, **422**, 72-76
- Ho, M. W., Ryan, A., Cummins, J. (1999). Cauliflower mosaic viral promoter - a recipe for disaster. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **11**, 194-197.
- Ipharraguerre, I.R., Younker, R.S., Clark, J.H., Stanisiewski, E.P. and Hartnell, G.F., 2003. Performance of lactating dairy cows fed corn as whole plant silage and grain produced from a glyphosate-tolerant hybrid (event NK603). *J. Dairy Sci.*, **86**, 1734-1741.
- Jones, L., 2002. Revealing micro-RNAs in plants. *Trends in Plant Science*, **7**, 473-475.
- Kidd, M.T. and Kerr, B.J., 1997. Threonine responses in commercial broilers at 30 to 42 days. *J. Appl. Poult. Res.*, **6**, 362-367.
- Lei, S. and Van Beek, G., 1997. Influence of activity and dietary energy on broiler performance, carcass yield and sensory quality. *Br. Poult. Sci.*, **38**, 183-189.
- Metcalfe D.D., Astwood J.D., Townsend R, Sampson HA., Taylor SL., Fuchs RL., 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* ,**36(S)**, 165-186.
- Peak, S.D., Walsh, T.J., Benton, C.E. and Brake, J., 2000. Effects of two planes of nutrition on performance and uniformity of four strains of broiler chicks. *J. Appl. Poult. Res.*, **9**, 185-194.
- SCP, 1998a. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the genetically modified cotton, tolerant to glyphosate herbicide notified by the Monsanto Company (notification C/ES/97/01).  
[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out17\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out17_en.html)

SCP, 1998b. Opinion of Scientific Committee on Plants regarding submission for placing on the market of fodder beet tolerant to glyphosate notified by DLF-Trifolium, Monsanto and Danisco Seed (notification C/DK/97/01).

[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out16\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out16_en.html)

Smith, E.R., Pesti, G.M., Kakalli, R.I., Ware, G.O. and Menten, J.F.M., 1998. Further experiments on the influence of genotype and dietary protein on the performance of broilers. *Poult. Sci.*, 77, 1678-1687.

## **SCIENTIFIC PANEL MEMBERS**

Hans Christer Andersson, Detlef Bartsch, Hans-Joerg Buhk, Howard Davies, Marc De Loose, Michael Gasson, Niels Hendriksen, Colin Hill, Sirpa Kärenlampi, Ilona Kryspin-Sørensen, Harry Kuiper, Marco Nuti, Fergal O'Gara, Pere Puigdomenech, George Sakellaris, Joachim Schiemann, Willem Seinen, Angela Sessitsch, Jeremy Sweet, Jan Dirk van Elsas and Jean-Michel Wal

## **ACKNOWLEDGEMENT**

The Scientific Panel on Genetically Modified Organisms wishes to thank Andrew Chesson and Gijs Kleter for their contributions to the draft opinion.

**ANEXO II. Protocolo I: Equivalencia agronómica funcional de híbridos de maíz genéticamente modificados (GM) en evaluaciones de campo en el estado de Chihuahua. DAS-01507-1, MON-00603-6 y DAS-01507-1x MON-00603-6. (Se incluyen tres eventos, pues la metodología se aplicará simultáneamente en campo para los tres)**

**Protocolo Número:** 1

**Título del Estudio:** Equivalencia agronómica funcional de híbridos de maíz genéticamente modificados (GM) en evaluaciones de campo en el estado de Chihuahua. DAS-01507-1, MON-00603-6 y DAS-01507-1x MON-00603-6.

**Responsable:** PHI México SA de CV y Dow AgroSciences de México SA de CV

**Director del Estudio:** Fernando González Cenicerros

**Listado de los nombres e información de contacto de los investigadores responsables de la evaluación. (Los CV se encuentran en el anexo X)**

**Fernando González Ceniceros**

Gerente de Investigación MD  
PHI México, S.A. de C.V.  
Km. 1.6 Poniente  
San Miguel Cuyutlán C.P. 44660  
Mpio. de Tlajomulco de Zuñiga, Jal.  
Tel. (33) 3772-4290  
Fax. (33) 3772-4293  
[fernando.gonzalez@pioneer.com](mailto:fernando.gonzalez@pioneer.com)

**Juan Carlos Martínez Nicolás**

Asociado de Regulación Senior  
PHI México, S.A. de C.V.  
Carr. Guadalajara-Morelia, KM 21-8601-A  
Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.  
CP. 45645. Tel. (33) 36 79 79 79  
[juan.martinez@pioneer.com](mailto:juan.martinez@pioneer.com)

**Gary D. Thompson**

PG&B insect traits  
Dow AgroSciences  
Tel. 001 (317) 337-4579  
[gdtompson@dow.com](mailto:gdtompson@dow.com)

**Leonel Avilés Morales**

Investigación y Desarrollo  
Dow AgroSciences  
Culiacán, Sin.  
Tel. 667-751-2234 (Móvil)  
[LAVILESMORALES@dow.com](mailto:LAVILESMORALES@dow.com)

## **Regiones en el estado de Chihuahua en donde se solicita realizar la liberación experimental**

### **1. Región Cuauhtemoc**

Coordinado por los investigadores:  
Fernando González Ceniceros

### **2. Región Delicias/Jiménez**

Coordinado por los investigadores:  
Fernando González Ceniceros

## **1. Antecedentes y objetivo.**

### **1.1. Antecedentes.**

Los híbridos de maíz genéticamente modificados (GM) fueron desarrollados mediante retrocruzamiento del progenitor donador del gen con líneas endogámicas elite no transformadas. En este estudio, los materiales híbridos GM se compararán con sus contrapartes no modificadas (isohíbridos) para determinar si las características fenotípicas de los materiales modificados fueron alteradas por la presencia de los eventos integrados GM: DAS-01507-1, MON-00603-6 y DAS-01507-1 x MON-00603-6.

### **1.2. Objetivo.**

El objetivo del presente estudio es generar los datos que permitan estimar si la modificación genética de los eventos DAS-01507-1, MON-00603-6 y DAS-01507-1x MON-00603-6 han alterado la equivalencia agronómica en comparación con su control no modificado.

## **2. Cumplimiento de los requisitos regulatorios y de control de calidad.**

### **2.1. Cumplimiento con los requisitos regulatorios.**

Los estudios se llevarán a cabo bajo la coordinación de personal de las empresas y los investigadores mencionados. La siembra de los experimentos se realizará una vez que se cuente con el permiso de liberación al ambiente correspondiente así como el permiso de importación por parte de las autoridades competentes para todos y cada uno de los maíces GM propuestos.

### **2.2. Requerimientos de control de calidad.**

Se describen las expectativas mínimas de calidad para la realización del estudio y su documentación dentro de este protocolo.

### **3. Duración del estudio.**

#### **3.1. Fecha de inicio propuesta: Ver cuadro 2.**

### **4.0. Diseño del estudio.**

#### **4.1. Materiales de prueba, controles y referencia de los maíces híbridos GM.**

##### **4.1.1. Materiales de prueba GM.**

- 1.- DAS-01507-1
- 2.- MON-00603-6
- 3.- DAS-01507-1x MON-00603-6

##### **4.1.2. Controles.**

El híbrido convencional a utilizar como control de la evaluación, fue desarrollado mediante mejoramiento genético tradicional, el cual posee un fondo genético común al maíz transformado con el evento DAS- 01507-1

##### **4.1.3. Referencias.**

Los materiales de referencia son híbridos comerciales que no expresan la característica de cada evento específico incluidos en este estudio. En este estudio, se incluirán plantas GM, el control isogénico y un híbrido comercial con diferente fondo genético al maíz GM y a su línea isohíbrida. Las referencias se incluyen para proporcionar información sobre la variabilidad natural que es común a los materiales de maíz híbrido.

#### **4.2. Caracterización de la semilla inicial de prueba y control.**

Se utilizarán tiras reactivas para la verificación de los materiales GM y sus controles correspondientes.

La semilla del material de referencia se obtendrá de PHI México SA de CV/Dow AgroSciences de México SA de CV.

#### **4.3. Justificación de los sitios seleccionados para el estudio.**

Los experimentos se localizarán en las tierras de agricultores cooperantes, en las regiones referidas en las solicitudes de liberación al medio ambiente que amparan a este Protocolo de Investigación. Estas localidades son representativas de las áreas de producción agrícola en México. El manejo agronómico será de acuerdo a las guías técnicas para el cultivo del maíz desarrolladas por INIFAP para dichas zonas.

#### **4.4. Características y descripción del área donde se realizará el estudio.**

El investigador principal proporcionará la caracterización y descripción del área de estudio. La información incluirá; tipo de suelo, % de materia orgánica, pH, pendiente y el historial de cultivos de dos años en la localidad.

#### **4.5. Procedimiento para la identificación de las parcelas.**

Los ensayos serán debidamente identificados y cada parcela será etiquetada con un número único tal como se asigna en la sección de aleatorización de la parcela.

#### **4.6. Embarque, recepción y almacenamiento de la semilla para iniciar el experimento.**

Se cumplirá con los requerimientos establecidos por SAGARPA para el embarque, recepción y almacenamiento de la semilla experimental.

#### **4.7. Prevención de la mezcla involuntaria de las semillas para iniciar la evaluación y del grano a cosechar.**

Cada material será manejado empleando bolsas o sobres de campo perfectamente identificados e independientemente embalados.

#### **4.8. Descripción del diseño experimental.**

##### **4.8.1. Información sobre parcelas.**

El investigador principal de cada estudio establecerá las plantas de los materiales de prueba, controles y referencias bajo un diseño de bloques completos al azar con parcelas apareadas y cuatro repeticiones.

La aleatorización de las parcelas (números de las parcelas y sus correspondientes números de materiales) para cada sitio de estudio será predeterminado y proporcionado en la sección correspondiente del libro de campo (La aleatorización aparece ya en el croquis al final de este protocolo)

Cada repetición consistirá de 8 surcos distribuidos en 4 grupos. Las parcelas corresponderán a:

- 1) 2 surcos del híbrido de referencia
- 2) 2 surcos del isohíbrido convencional
- 3) 2 surcos del híbrido GM
- 4) 2 surcos del híbrido de referencia (ver croquis).

Los grupos 2 y 3 corresponderán a las parcelas apareadas. El híbrido de referencia se colocará a los extremos de las parcelas apareadas para evitar el efecto de borde. Cada surco será de 5 metros de largo con un espacio entre surcos de 0.8 metros. El ensayo completo será rodeado con un bordo de maíz convencional que consistirá de 4 surcos, el cual será sembrado al momento del establecimiento del experimento.

Cuadro 1. Cantidad de semilla de maíz GM a utilizar en cada localidad

Tratamiento	Surcos	Metros de siembra/ parcela <sup>(1)</sup>	Semillas/ parcela <sup>(2)</sup>	Semillas/ ensayo <sup>(3)</sup>	Cantidad en kg <sup>(4)</sup>
1. DAS-01507-1	2	10	90	360	0.120
2. MON-00603-6	2	10	90	360	0.120
3. DAS-01507-1x MON-00603-6	2	10	90	360	0.120

<sup>(1)</sup> 2 surcos de 5 m cada uno = 10 m.

<sup>(2)</sup> 9 semillas/m, 90 semillas/10 m.

<sup>(3)</sup> 90 semillas/parcela x 4 parcelas (4 repeticiones) = 360 semillas/ensayo.

<sup>(4)</sup> Cantidad en kg (kg) = (Semilla por ensayo)/3000 = 0.120 kg (3000 semillas = 1 kg).

Se anexa un croquis representativo del ensayo y se indica el detalle de cada parcela.

Cuadro 2. Localidades, fechas de siembra y cantidad total de semilla requerida para la evaluación de la equivalencia agronómica funcional del maíz GM en las diferentes regiones de Chihuahua

Sitio propuesto para el programa	Fecha de importación la semilla (2010)	Fecha límite siembra (2010)	Superficie		Total de semilla de maíz GM (kg)
			Superficie total del experimento (m <sup>2</sup> ) <sup>(1)</sup>	Superficie de maíz GM (m <sup>2</sup> ) <sup>(2)</sup>	
Cuauhtemoc	Marzo	Abril	891	96	0.360
Delicias/Jiménez	Marzo	Abril	891	96	0.360
<b>Totales</b>			<b>1782</b>	<b>192</b>	<b>0.72</b>

<sup>(1)</sup> Incluye parcelas experimentales con todos los materiales a evaluar, calles entre repeticiones y bordos.

<sup>(2)</sup> Superficie maíz GM para los tres eventos, considerando, 2 surcos de 5 m de largo con una separación entre surcos de 0.8 m por parcela y 4 repeticiones.

#### 4.8.2. Distancia de aislamiento.

Se tendrá una distancia de aislamiento de cualquier otra parcela donde se siembre maíz ajeno al experimento, de **300 m a la redonda**. No se desespigarán las plantas de maíz GM.

### **4.8.3. Métodos de siembra.**

El método de siembra será manual

Nota: Es importante que el área completa del estudio, incluyendo los surcos de bordo, sean tratados con los mismos insumos agrícolas y en las mismas dosis, para asegurar condiciones agronómicas uniformes.

#### **4.8.3.1. Preparación del área de estudio (previo a la siembra).**

El área de estudio será preparada de acuerdo a lo requerido en la localidad y a las demandas del cultivo (por ejemplo, rastras, irrigación, fertilizantes y plaguicidas) para la obtención de un cultivo agronómicamente bien manejado.

#### **4.8.3.2. Fecha de siembra y condiciones ambientales.**

La siembra se realizará en el ciclo Primavera-Verano del 2009. Los datos ambientales a ser recabados durante la siembra serán: temperatura del aire, temperatura del suelo y humedad del suelo, para lo cual se tomará una muestra representativa del lugar, en un envase con cierre hermético para evitar la pérdida de agua y se llevará a un laboratorio de suelos.

#### **4.8.3.3. Información de la siembra.**

Cada parcela será sembrada con aproximadamente 360 semillas (45 semillas por surco). En el caso de las parcelas con material GM, se sembrarán 90 semillas por los dos surcos.

Se espera que toda la semilla sea sembrada. Sin embargo, cualquier remanente de semilla después de la siembra será destruido.

#### **4.8.3.4. Control de insectos, enfermedades y maleza (al sembrar).**

El control de insectos, enfermedades y maleza se llevará a cabo de acuerdo a las guías técnicas del INIFAP para el cultivo del maíz para esta región.

### **4.8.4. Manejo de las parcelas durante la etapa de desarrollo del cultivo.**

La totalidad del área de estudio, incluyendo los surcos de bordo, será tratada con los mismos insumos agronómicos y con las mismas dosis para asegurar condiciones agronómicas homogéneas.

#### **4.8.4.1. Aclareo de la parcela.**

Las parcelas serán raleadas para tener un máximo de 30 plantas por surco.

Nota: Si la población objetivo no se puede alcanzar debido a una pobre emergencia, todas las parcelas se deberán ralea a una densidad uniforme para asegurar que se obtenga un crecimiento, desarrollo y producción comparable entre los diferentes materiales a evaluar.

#### **4.8.4.2. Control de insectos, enfermedades y plagas (post-siembra).**

El control de insectos, enfermedades y maleza se llevará a cabo de acuerdo a la guía técnica del INIFAP para el cultivo del maíz aplicable.

Nota: En localidades con alta presión de plagas se recomienda la aplicación preventiva de insecticidas para eliminar variabilidad entre materiales *Bt* y sus correspondientes isohíbridos convencionales.

#### **4.8.4.3. Cultivo.**

El investigador principal proporcionará los detalles sobre las aplicaciones realizadas (métodos de operación y fechas) que fueron necesarias para producir un cultivo aceptable agronómicamente.

#### **4.8.4.4. Fertilización.**

El investigador principal proporcionará los detalles sobre la aplicación de fertilizantes (producto, dosis y fecha de aplicación) necesarios para producir un cultivo aceptable agronómicamente.

#### **4.8.4.5. Riegos.**

El investigador principal proporcionará los detalles de los riegos aplicados que fueron necesarios para obtener un cultivo aceptable agronómicamente.

### **4.9. Obtención de datos.**

#### **4.9.1. Datos fenotípicos.**

Las características fenotípicas y las instrucciones para su obtención se indican en seguida.

##### **4.9.1.1. Vigor de plántulas (VP).**

Cuando el maíz alcance en promedio la etapa de desarrollo V2-V4, se determinará el valor del vigor de las plántulas. Una escala de 0-9 será utilizada en la que,

1 = muerta,

2-3 abajo del vigor promedio,

4-6 = vigor promedio y

7-9 sobre el vigor promedio.

Estos datos se deben determinar antes del raleo manual y/o la primera labor de cultivo.

#### **4.9.1.2. Emergencia (Em).**

Cuando el maíz alcance la etapa de desarrollo promedio de V2-V4, se determinará la cantidad de plántulas emergidas por parcela. Este número de plantas por parcela deberá ser determinado antes del raleo manual y/o la primera labor de cultivo.

#### **4.9.1.3. Días a 50% de aparición de estigmas (JI).**

Se determinará la fecha en la que el 50% de las plantas de la parcela presenten estigmas de 2 cm. de largo.

#### **4.9.1.4. “Stay green” (SG).**

El “stay green” se determinará cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo R6 (madurez fisiológica). Se utilizará una escala 1 – 9 donde:

1 = la planta completa se encuentra seca,

5 = las hojas bajo la mazorca se encuentran secas y las superiores verdes, y

9 = la planta completa se encuentra verde.

#### **4.9.1.5. Altura de mazorca (AM).**

La altura de la mazorca se determinará desde la superficie del suelo a la base del nudo donde se encuentra unida la mazorca. Se cuantificará cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo R2 y se cuantificará la altura de la mazorca en 5 plantas representativas de cada parcela.

#### **4.9.1.6. Altura de planta (AP).**

La altura de las plantas se cuantificará desde la superficie del suelo hasta la lígula de la hoja bandera. Se determinará cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo R2 y se cuantificará la altura de 5 plantas representativas de cada parcela.

#### **4.9.1.7. Mazorcas caídas (MC).**

Dentro de 4 días previos a la cosecha se cuantificará el número de mazorcas caídas por parcela. Las mazorcas caídas serán aquellas que se encuentren en el suelo completamente desprendidas de la planta.

#### **4.9.1.8. Acame del tallo (AT).**

Dentro de los 4 días previos a la cosecha se cuantificará el número de plantas por parcela quebradas por debajo de la mazorca. Los tallos quebrados por arriba de la mazorca principal no se incluirán dentro de estos datos.

#### **4.9.1.9. Acame de raíz (AR).**

Dentro de los 4 días previos a la cosecha se cuantificará el número de plantas con acame de raíz por parcela (excluyendo tallos quebrados). Las plantas con acame de raíz serán aquellas que se encuentran inclinadas en más de 30° respecto de la vertical.

#### **4.9.1.10. Conteo final de plantas (CF).**

Dentro de los 4 días previos a la cosecha se determinará el número de plantas por parcela. Las plantas con acame de tallo o raíz serán incluidas en estos datos.

#### **4.9.1.11. Peso de la parcela (PP).**

A la cosecha (o después del secado de las mazorcas cosechadas a mano, si es necesario) se cuantificará el peso del grano obtenido de cada parcela. El grano proveniente de las plantas identificadas con pudrición del tallo debe ser incluido en el peso de la parcela.

#### **4.9.1.12. Humedad del grano (HG).**

A la cosecha (o después del secado de las mazorcas cosechadas a mano, si es necesario) se cuantificará el porcentaje de humedad del grano cosechado de cada parcela.

La severidad de varios síntomas bióticos (por ejemplo, insectos, enfermedades) y abióticos (por ejemplo viento, sequía, granizo) se registrarán en las parcelas en por lo menos cuatro etapas de desarrollo: en plántulas, crecimiento vegetativo, etapa reproductiva intermedia y cosecha. En cada una de estas etapas especificadas se evaluará y anotará la severidad de los síntomas del agente de estrés por parcela en por lo menos un insecto, una enfermedad y un agente abiótico que comúnmente se presenta en el sitio de evaluación.

Se indican a continuación las características de estrés y las instrucciones para la recolección de los datos asociados.

#### **4.10.1. Presencia de agentes estresantes en etapa de plántula.**

Cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo V2-V4, se observará la severidad del daño ocasionado por insectos, enfermedades y factores abióticos. Se utilizará para ello la siguiente escala, donde:

9 = ningún daño (no se observan síntomas),

6-8 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas),

3-5 = daño moderado (intermedio), y

1-2 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

Si se observa un factor de estrés como insecto, enfermedad o factor abiótico después de la observación en etapa de plántula (V2-V4) pero antes de la observación en etapas vegetativas (V10-V15), anotar la severidad de los síntomas del agente estresante por parcela empleando la misma escala y documentar la etapa de desarrollo promedio de las plantas.

Los agentes estresantes de la raíz deberán ser identificados utilizando únicamente los síntomas visuales en la parte aérea de la planta.

#### **4.10.2. Presencia de agentes estresantes en etapa de desarrollo vegetativo.**

Cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo V10-V15, se observará la severidad del daño ocasionado por insectos, enfermedades y factores abióticos. Se utilizará para ello la siguiente escala, donde:

9 = ningún daño (no se observan síntomas),

6-8 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas),

3-5 = daño moderado (intermedio), y

1-2 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

Si se observa un factor de estrés como insecto, enfermedad o factor abiótico después de la etapa de desarrollo vegetativo (V10-V15) pero antes de la observación en la etapa de floración (R1-R3), anotar la severidad de los síntomas del agente estresante por parcela empleando la misma escala y documentar la etapa de desarrollo promedio de las plantas.

#### **4.10.3. Presencia de agentes estresantes en etapa de floración.**

Cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo R1-R3, se observará la severidad del daño ocasionado por insectos, enfermedades y factores abióticos. Se utilizará para ello la siguiente escala, donde:

9 = ningún daño (no se observan síntomas),

6-8 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas),

3-5 = daño moderado (intermedio), y

1-2 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

Si se observa un factor de estrés como insecto, enfermedad o factor abiótico después la observación en etapa de floración (R1-R3), pero antes de la observación en etapa de cosecha (R6), anotar la severidad de los síntomas del agente estresante por parcela empleando la misma escala y documentar la etapa de desarrollo promedio de las plantas.

#### **4.10.4. Presencia de agentes estresantes en etapa de cosecha.**

Cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo R6, pero antes de la cosecha, se observará la severidad del daño ocasionado por insectos, enfermedades y factores abióticos. Se utilizará para ello la siguiente escala, donde:

9 = ningún daño (no se observan síntomas),  
6-8 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas),  
3-5 = daño moderado (intermedio), y  
1-2 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

#### **4.10.5. Enfermedad “pudrición del tallo”.**

Al cosechar se determinará la incidencia de la pudrición del tallo en 5 plantas representativas de la parcela. El tallo de cada planta se cortará en forma longitudinal y se examinará en busca de tejido de conducción fragmentado o decolorado. Se utilizará para ello la siguiente escala, donde:

9 = ningún daño (no se observan síntomas),  
6-8 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas),  
3-5 = daño moderado (intermedio), y  
1-2 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

La severidad de la pudrición del tallo se tomará con base a planta en lugar de parcela. Aunque esta es una evaluación destructiva, el grano de las plantas analizadas deberá ser incluido en la cuantificación del rendimiento de la parcela.

#### **4.10.6. Pudrición de la mazorca y granos.**

Al momento de la cosecha se determinará la incidencia de pudrición de la mazorca y granos en 5 mazorcas (una por planta) representativas de la parcela. Se le quitan las hojas a la mazorca, de tal manera que se pueda cuantificar la cantidad de granos infectados, pero la mazorca deberá permanecer unida al tallo, de tal manera que sea incluida en la determinación del rendimiento de la parcela. El grano de las plantas analizadas deberá ser incluido en el rendimiento final de la parcela. Se utilizará una escala de 1-9 donde:

9 = ningún síntoma (no se observan síntomas),  
6-8 = ligero (síntomas observados pero no parecen ser detrimentales para la calidad del grano y el rendimiento),  
3-5 = moderado (intermedio), y  
1-2 = severo (con síntomas observados y disminuyen la calidad del grano y el rendimiento).

Los valores asignados a la pudrición de la mazorca y los granos se tomarán en base a mazorca en lugar de parcela. El grano de las mazorcas analizadas deberá ser incluido en el rendimiento final de la parcela.

#### **4.11. Análisis de datos.**

El experimento propuesto será analizado empleando un programa de análisis estadístico para comparar cada material de prueba con su respectivo control. No se realizarán comparaciones estadísticas entre el material de prueba y las plantas utilizadas como

referencia. El material de prueba será comparado con el material de control en cada localidad (por localidad) y en conjunto de todas las localidades. Se reportarán las medias de cada material de prueba y control y los resultados de los análisis estadísticos. Los valores mínimo y máximo (el rango de referencia) y si es necesario un intervalo de tolerancia del 99% con una confianza del 95% será determinado a partir del material de referencia. No se realizarán comparaciones estadísticas entre los materiales de prueba y referencia.

Los datos reportados para cada material incluirán, aunque no serán limitativos a:

- Vigor de plántula
- Días al 50% de la liberación de polen
- Días al 50% de la aparición de los estigmas
- Stay Green
- Altura de mazorca
- Altura de planta
- Mazorcas caídas (número por parcela)
- Plantas acamadas del tallo (número por parcela)
- Plantas acamadas de la raíz (número por parcela)
- Conteo final de plantas establecidas (número por parcela)
- Peso de Grano (desgranar toda la parcela útil y pesarla en Kg.)
- Porcentaje de humedad del grano
- Rendimiento (ton/ha) corregido a 14% de humedad. El rendimiento en Kg./ha será calculado empleando la siguiente fórmula:

Rendimiento (ton/ha) =  $\frac{((100-\%Hum)/86) \times \text{Peso de Campo}}{L \times W \times N} \times 10$

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

## **5. Registros a conservar.**

### **5.1. Registros del sitio de estudio.**

Además de la información descriptiva del sitio del estudio que se solicita en este protocolo, se deberá proporcionar la información general y actual por el investigador principal. Esta información incluirá lo siguiente:

- a.) Nombre, dirección, ciudad, municipio, estado y teléfono del sitio.
- b.) Mapa del sitio indicando el acceso al lugar del estudio desde caminos locales.

- c.) Diagrama de las parcelas indicando las coordenadas de latitud y longitud de su ubicación (GPS).
- d.) Altura sobre el nivel del mar.
- e.) Historial del sitio de estudio de los dos años previos incluyendo plaguicidas empleados, caracterización del suelo y cualquier otro dato relevante al estudio.

## **5.2. Requerimientos para los datos.**

El Director de estudio proporcionará un libro de campo que contendrá las hojas para el registro de datos y procedimientos requeridos por este protocolo. El cuaderno de campo y los datos crudos suplementarios deberán ser precisos, escritos con tinta indeleble azul o negra y registrados el mismo día de su obtención. Todas las páginas deberán quedar firmadas y fechadas. Todos los registros deberán ser fechados el día de su ingreso y firmados o con las iniciales del responsable al menos una vez en cada página. Si más de una persona registra datos en una página deberá quedar claro qué individuo registra qué dato. Cualquier copia de los datos crudos que sustituya la original debe ser certificada con las palabras “copia exacta” y certificada con las iniciales fechadas de la persona que realiza la copia. El investigador principal deberá firmar al final de todas las páginas del cuaderno verificando la claridad y que todos los registros sean completos.

Se recomienda incluir fotografías de las parcelas y apariencia morfológica de las plantas para complementar la documentación de los resultados del estudio. Las fotografías deberán estar certificadas mediante la incorporación del número de protocolo, código del sitio, iniciales fechadas y una breve descripción del objeto de la fotografía. Las fotografías electrónicas deberán estar numeradas y descritas en el cuaderno del estudio.

El cuaderno de trabajo original junto con toda la información complementaria y datos de apoyo será enviado al Responsable del Experimento dentro de las siguientes cuatro semanas de que finalizó el estudio.

## **5.3. Datos del clima.**

Los datos del clima deberán ser proporcionados por la estación climatológica más cercana al experimento. Los datos requeridos por este protocolo son las temperaturas máxima y mínima del aire registradas diariamente y el informe diario sobre precipitaciones o riegos (si es que se utiliza riego) incluyendo las fechas y cantidad durante la duración del estudio. Además a los datos climáticos actuales, hay que proporcionar los promedios máximo y mínimo de la temperatura del aire y precipitación promedio mensual de los últimos años. El investigador principal deberá proveer cualquier otro dato climatológico o evento que pudiera influir en la conducción o integridad del estudio.

## **5.4. Reporte final.**

El Director del estudio, o el designado para ello, preparará un reporte final que incluirá la descripción de los resultados de este estudio y un análisis de la calidad de todos los datos y procedimientos requeridos en el protocolo. El reporte final tendrá un formato de artículo

científico e incluirá las siguientes secciones: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Figuras y Tablas.

### **5.5. Retención de los registros.**

El libro de campo y los registros suplementarios se almacenarán en un lugar seguro. El libro de campo será revisado por el investigador principal para verificar que se encuentre completo y lo enviará al Responsable del Experimento (o la persona a quien se ha delegado esta responsabilidad), en un plazo dentro de las cuatro semanas siguientes a que se ha finalizado el estudio. Los reportes finales se almacenarán en donde la autoridad lo considere conveniente.

### **6. Conducción del estudio.**

#### **6.1. Reportes.**

Las preguntas e información sobre la conducción del estudio se dirigirán al Director del estudio.

#### **6.2. Disposición del grano cosechado y del material vegetal remanente del OGM.**

Una vez que sea recopilada la información del peso de grano de la parcela, la humedad del grano y el dato del peso específico, todo el grano GM cosechado y el material vegetativo remanente en las parcelas, caminos y surcos borderos deberán ser destruidos.

#### **6.3. Monitoreo post-cosecha en búsqueda de plantas voluntarias.**

Después de la destrucción del cultivo, se establecerá un programa de monitoreo en busca de plantas voluntarias durante los dos ciclos de cultivo siguientes.

### **7. Referencias.**

Keltgen Seed production booklet for 1995-1996. Page 72. Keltgen Seed, Box 207, Olivia, MN 56277.

Luna, SV, Figueroa, JM, Baltazar, MB, Gómez, RL, Townsend, R and JB Schoper, 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for pollen control. Crop Science 41: 1551-1557.

**Croquis. PROTOCOLO # 1. Equivalencia agronómica funcional de híbridos de maíz genéticamente modificados (GM) en evaluaciones de campo en México.**

**DAS-01507-1**

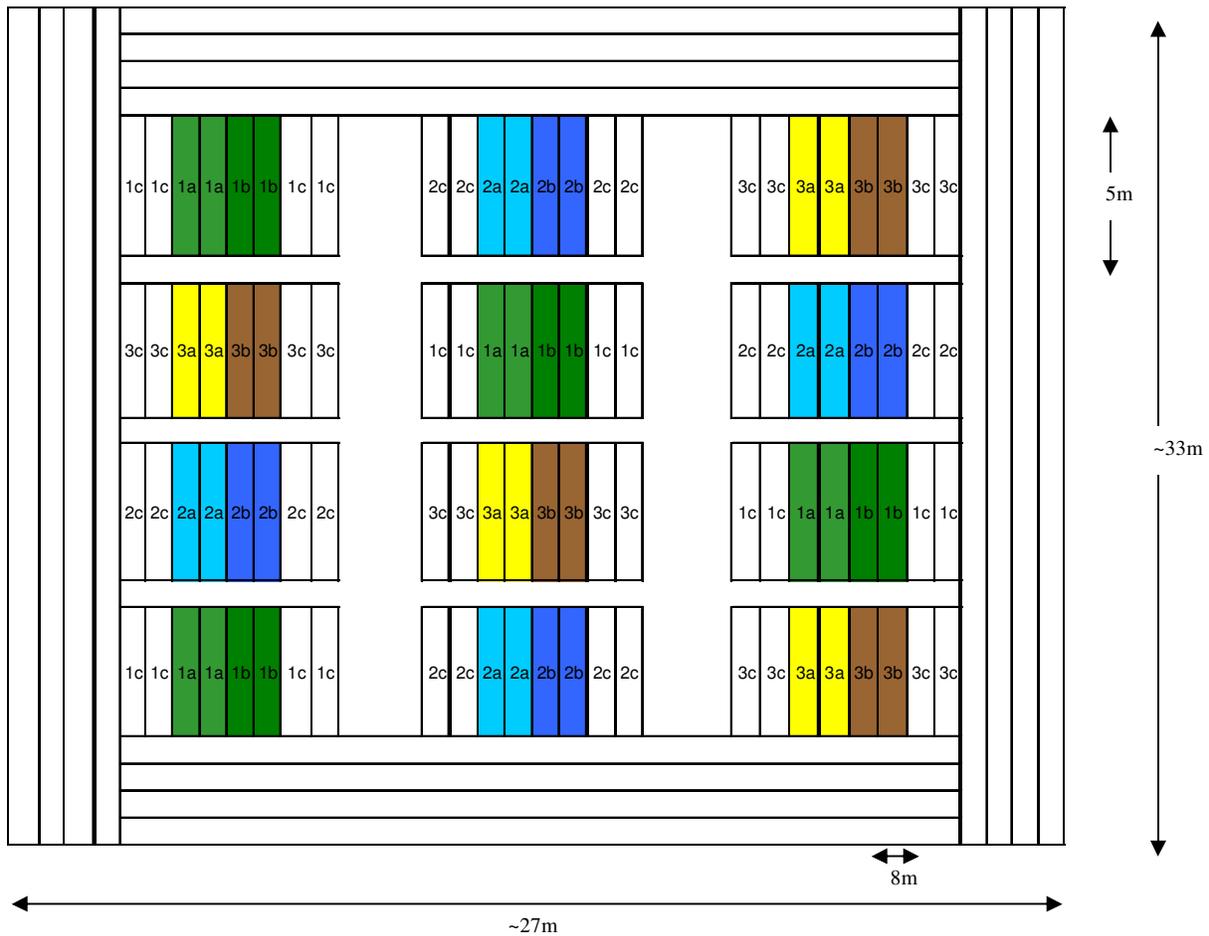
**MON-00603-6**

**DAS-01507-1x MON-00603-6.**

**Isohíbrido (1a) + DAS-01507-1 (1b) + Híbrido de referencia (1c)**

**Isohíbrido (2a) + MON-00-603-6 (2b) + Híbrido de referencia (2c)**

**Isohíbrido (3a) + DAS-01507 x MON-00-603-6 (3b) + Híbrido de referencia (3c)**



No habrá separación entre parcelas, solo entre repeticiones, en el croquis se ha puesto separación solo para efectos de visualización de parcelas.

**ANEXO III. Protocolo 2: Efectividad biológica y beneficios potenciales del evento  
MON-00603-6 en maíz para el estado de Chihuahua.**

**Protocolo Número:** 2

**Título del Estudio:** Efectividad biológica y beneficios potenciales del evento MON-00603-6 en maíz para el estado de Chihuahua.

**Responsable:** PHI México SA de CV y Dow AgroSciences de México SA de CV

**Director del Estudio:** Fernando González Ceniceros

**Listado de los nombres e información de contacto de los investigadores responsables de la evaluación. (Los CV se encuentran en el anexo X)**

**Fernando González Ceniceros**

Gerente de Investigación MD  
PHI México, S.A. de C.V.  
Km. 1.6 Poniente  
San Miguel Cuyutlán C.P. 44660  
Mpio. de Tlajomulco de Zuñiga, Jal.  
Tel. (33) 3772-4290  
Fax. (33) 3772-4293  
[fernando.gonzalez@pioneer.com](mailto:fernando.gonzalez@pioneer.com)

**Juan Carlos Martínez Nicolás**

Asociado de Regulación Senior  
PHI México, S.A. de C.V.  
Carr. Guadalajara-Morelia, KM 21-8601-A  
Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.  
CP. 45645. Tel. (33) 36 79 79 79  
[juan.martinez@pioneer.com](mailto:juan.martinez@pioneer.com)

**Gary D. Thompson**

PG&B insect traits  
Dow AgroSciences  
Tel. 001 (317) 337-4579  
[gdtompson@dow.com](mailto:gdtompson@dow.com)

**Leonel Avilés Morales**

Investigación y Desarrollo  
Dow AgroSciencesdow  
Culiacán, Sin.  
Tel. 667-751-2234 (Móvil)  
[LAVILESMORALES@dow.com](mailto:LAVILESMORALES@dow.com)

## **Regiones en el estado de Chihuahua en donde se solicita realizar la liberación experimental**

### **1. Región Cuauhtemoc**

Coordinado por los investigadores:  
Fernando González Ceniceros  
Gerente de Investigación de PHI México

### **2. Región Delicias/Jiménez**

Coordinado por los investigadores:  
Fernando González Ceniceros  
Gerente de Investigación de PHI México

#### **1.0 Antecedentes y objetivo.**

##### **1.1 Antecedentes.**

Si bien se ha discutido en muchos foros sobre los posibles riesgos del cultivo de maíz GM en México y se ha solicitado información de sus efectos en el medio ambiente, la diversidad biológica y la salud animal y humana, es necesario demostrar mediante un análisis imparcial y objetivo los beneficios que podría presentar el cultivo del maíz GM en nuestro país.

Por lo anterior, es fundamental proceder a la experimentación de campo en donde se cuantifiquen los beneficios de las variedades GM de maíz al medio ambiente, al agricultor y sobre la calidad de la cosecha.

El evento MON-00603-6 en maíz se ha desarrollado, a través del uso de técnicas de DNA recombinante, que integran el gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium sp.* cepa CP4. La enzima CP4 EPSPS que expresa el maíz MON-00603-6 presenta afinidad reducida al glifosato cuando se compara a la enzima nativa del maíz. Las plantas de maíz que expresan la enzima CP4 EPSPS son tolerantes a aplicaciones totales del herbicida Glifosato.

##### **1.2 Objetivo.**

- a) Evaluar la respuesta de híbridos de maíz MON-00603-6 con germoplasma adaptado a las condiciones de campo en México para el control de maleza mediante aplicación del herbicida glifosato.
- b) Comparar el sistema de control de malezas usando glifosato en maíz MON-00603-6, con los métodos tradicionales para el control de maleza.
- c) Evaluar la relación costo-beneficio del evento MON-00603-6 en el control de maleza bajo las condiciones normales de producción de maíz en este ensayo.

## **2.0 Cumplimiento de los requisitos regulatorios y de control de calidad.**

### **2.1 Cumplimiento con los requisitos regulatorios.**

Los estudios se llevarán a cabo bajo la supervisión de personal de las empresas y de los investigadores mencionados. La siembra de los experimentos se realizará una vez que se cuente con el permiso de liberación al ambiente correspondiente así como del permiso de importación por parte de las autoridades competentes para todos y cada uno de los maíces GM propuestos.

### **2.2 Requerimientos de control de calidad.**

Se describen las expectativas mínimas de calidad para la realización del estudio y su documentación dentro de este protocolo.

### **3.0 Duración del estudio.**

3.1 Fecha de inicio propuesta: Ver cuadro N° 2

### **4.0 Diseño del estudio.**

#### **4.1 Material de prueba (híbrido).**

Un híbrido de maíz con el evento MON-00603-6 adaptado a las condiciones de México.

#### **4.2 Controles (Isohíbridos convencionales).**

El híbrido convencional a utilizar como controles de la evaluación fue desarrollado mediante mejoramiento convencional, el cual posee un fondo genético común al maíz con el evento MON-00603-6.

##### **4.2.1 Referencias.**

Los materiales de referencia son híbridos comerciales que no expresan la característica de cada evento específico incluidos en este estudio. En este estudio, se incluirán plantas GM, el control isogénico y un híbrido comercial con diferente fondo genético al maíz GM y a su línea isohíbrida. Las referencias se incluyen para proporcionar información sobre la variabilidad natural que es común a los materiales de maíz híbrido.

#### **4.3 Justificación de los sitios seleccionados para el estudio.**

El experimento se localizará en los campos de agricultores cooperantes en las regiones referidas en esta solicitud. Estas localidades son representativas de las áreas de producción agrícola en México. El manejo agronómico será de acuerdo a las guías técnicas para el cultivo del maíz desarrolladas por INIFAP.

## 2.1 Descripción del diseño experimental.

Diseño de Bloques completos al azar con parcelas apareadas y 4 repeticiones.

Dimensiones de parcela:

- Distancia entre surcos: 80 cm
- Longitud de surcos: 5 m
- Número de surcos/parcela: 8 (2 de isohíbrido convencional a los lados de las parcelas apareadas + 2 de híbrido convencional + 2 de híbrido GM. La disposición en campo no utilizará separación entre parcelas; las calles separarán las repeticiones.
- Superficie de parcela experimental total: 24 m<sup>2</sup>; superficie útil: 16 m<sup>2</sup>.
- Superficie total del experimento (incluyendo calles entre repeticiones y bordos): 1,568 m<sup>2</sup>.
- Superficie total de maíz GM: 320 m<sup>2</sup>
- Tipo de siembra: manual; se realizará aclareo de las parcelas para dejar 30 plantas/surco.

### Información sobre parcelas.

El investigador principal de cada estudio establecerá las plantas de los materiales de prueba y controles bajo un diseño de bloques completos al azar con parcelas apareadas y cuatro repeticiones.

La aleatorización de las parcelas (números de las parcelas y sus correspondientes números de materiales) para cada sitio de estudio será predeterminado y proporcionado en la sección correspondiente del libro de campo (la aleatorización se muestra en el croquis que se presenta al final de este protocolo)

Cada repetición consistirá de 8 parcelas distribuidas completamente al azar (3 parcelas con isohíbridos exclusivamente y con 6 surcos y 5 parcelas apareadas de 8 surcos.

Las parcelas con isohíbridos consistirán de 6 surcos (2 surcos de híbrido de referencia a cada lado de dos surcos centrales con el isohíbrido) las parcelas apareadas consistirán de 8 surcos de 5 m de largo (2 surcos de híbrido de referencia a cada lado de la parcela apareada, dos surcos de isohíbrido convencional y dos surcos de híbrido GM) con un espacio entre surcos de 0.8 metros. Además, para evitar efectos por competencia no se incluirá espacio entre parcelas. El ensayo será rodeado con un bordo de maíz convencional que consistirá de 4 surcos a cada lado del experimento y un rango adicional al inicio y al final del experimento. El bordo será sembrado siguiendo la misma metodología de establecimiento del experimento y misma fecha.

Nota: Se tendrá cuidado especial cuando el maíz GM corresponda a uno tolerante a herbicida y se realice la aspersión a fin de eliminar la posibilidad de que la deriva llegue a las plantas convencionales. Se emplearán plásticos para evitar que el herbicida tenga contacto con las plantas convencionales.

Cuadro 1. Cantidad de semilla de maíz MON-00603-6 a utilizar por localidad.

Tratamiento <sup>(1)</sup>	Surcos	Metros de siembra/ parcela <sup>(2)</sup>	Semillas/ parcela <sup>(3)</sup>	Semillas/ ensayo <sup>(4)</sup>	Cantidad en kg <sup>(5)</sup>
MON-00603-6	40	10	90	1800	0.6

<sup>(1)</sup> 5 tratamientos MON-00603-6 por repetición

<sup>(2)</sup> 2 surcos de 5 m cada uno = 10 m

<sup>(3)</sup> 9 semillas/m, 90 semillas/10 m

<sup>(4)</sup> 90 semillas/parcela x 5 parcelas x 4 repeticiones = 1800 semillas/ensayo

<sup>(5)</sup> Cantidad en kg = (Semilla por ensayo)/3000 = 0.6 kg (3000 semillas = 1 kg)

Se anexa un croquis representativo del ensayo.

Cuadro 2. Localidad, fecha de siembra y cantidad total de semilla requerida para la evaluación de la efectividad biológica y beneficios potenciales del maíz MON-00603-6.

Sitio propuesto para el programa	Fecha de importación de la semilla (2010)	Fecha límite de siembra (2010)	Superficie		Total de semilla de maíz GM (kg)
			Superficie total del experimento (m <sup>2</sup> ) <sup>(1)</sup>	Superficie maíz GM (m <sup>2</sup> ) <sup>(2)</sup>	
Cuauhtemoc	Marzo	Abril	1749	160	0.6
Delicias/Jiménez	Marzo	Abril	1749	160	0.6
<b>Total</b>			<b>3498</b>	<b>320</b>	<b>1.2</b>

<sup>(1)</sup> Incluye parcelas experimentales con todos los materiales a evaluar, calles entre repeticiones y bordos.

<sup>(2)</sup> Superficie MON-00603-6, 2 surcos de 5 m de largo con una separación entre surcos de 0.8 m, 20 parcelas (5 parcelas por repetición y 4 repeticiones).

### Distancia de aislamiento.

Se tendrá una distancia de aislamiento de cualquier otra parcela donde se siembre maíz ajeno a los experimentos de 300 metros. No se considera desespigue para el maíz GM.

### Preparación del área de estudio (previo a la siembra).

El área de estudio será preparada de acuerdo a lo requerido en la localidad (por ejemplo, rastras, irrigación, fertilizantes y plaguicidas) para la obtención de un cultivo agronómicamente bien manejado.

### **Fecha de Siembra y condiciones ambientales.**

La siembra se realizará dentro de las fechas normales de cada localidad. Los datos ambientales a ser recabados durante la siembra serán: temperatura del aire, temperatura del suelo y humedad del suelo, para lo cual se tomará una muestra representativa del lugar, en un envase con cierre hermético para evitar la pérdida de agua y se llevará a un laboratorio de suelos.

### **Tratamientos:**

- 1) Isohíbrido convencional, control de maleza manual en caso necesario
- 2) Isohíbrido convencional, control de maleza químico diferente a Glifosato.
- 3) Isohíbrido convencional con aplicación de Glifosato.
- 4) Híbrido GM, control de maleza manual en caso necesario
- 5) Híbrido GM, 1 kg Glifosato en etapa V2-V4 + 1 kg en etapa V6-V8
- 6) Híbrido GM, 2 kg Glifosato en etapa V4 a V6
- 7) Híbrido GM, 2 kg Glifosato en etapa V6 a V8
- 8) Híbrido GM , Control pre-emergente (recomendación local) y 1 kg Glifosato en etapa V6 a V8

Se tomarán muestras de los tratamientos 4 al 8 para cuantificar niveles de residuos de glifosato en forraje, elote fresco y grano.

### **Variables de estudio (datos a obtener):**

- % clorosis (10 días después de aplicado el tratamiento [DDAT])
- % malformación (10 DDAT)
- altura de la planta (10 DDAT)
- % reducción visual de crecimiento (10 y 30 DDAT)
- Malezas presentes en el ensayo (0 DDAT)
- % control de maleza (15 DDAT)
- altura de planta y mazorca (al final de madurez fisiológica)
- acame (al final)
- a cosecha :

Rendimiento ajustado al 14% de humedad

### **Disposición del grano cosechado y del material vegetal remanente.**

Una vez que sea recopilada la información del peso de grano de la parcela, la humedad del grano y el dato del peso específico, todo el grano cosechado y el material vegetativo remanente en las parcelas, caminos y surcos borderos deberá ser destruido.

### **Monitoreo post-cosecha en búsqueda de plantas voluntarias.**

Después de la destrucción del cultivo, se establecerá un programa de monitoreo en busca de plantas voluntarias durante los dos ciclos de cultivo siguientes.

### **Análisis de datos.**

El modelo estadístico propuesto será analizado empleando un programa de análisis estadístico para comparar cada material de prueba con su respectivo control. El material de prueba será comparado con el material de control en cada localidad (por localidad) y en conjunto de todas las localidades. Se reportarán las medias de cada material de prueba y control y los resultados de los análisis estadísticos.

## **5.0 Registros a conservar.**

### **5.1 Registros del sitio de estudio.**

Además de la información descriptiva del sitio del estudio solicitada en este protocolo se deberá proporcionar información general y actual por el investigador principal. Esta información incluirá lo siguiente:

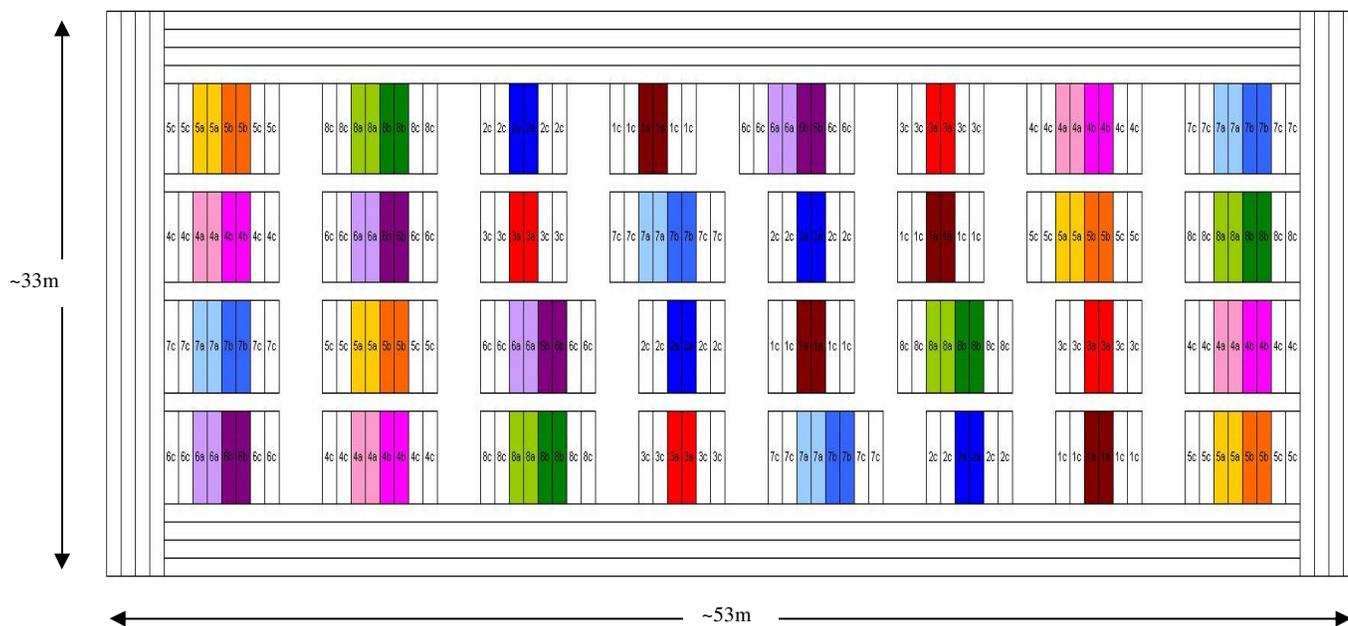
- e.) Nombre, dirección, ciudad, municipio, estado y teléfono del sitio.
- f.) Mapa del sitio indicando el acceso al lugar del estudio desde caminos locales.
- g.) Diagrama de las parcelas indicando las coordenadas de latitud y longitud de su ubicación (GPS).
- h.) Altura sobre el Nivel del Mar.
- e) Historial del sitio de estudio de los cinco años previos incluyendo cultivos sembrados, plaguicidas empleados, caracterización del suelo y cualquier otro dato relevante al estudio. Incluir los datos actuales e históricos del clima.

### **Reporte final.**

El Director de estudio o el designado para ello, preparará un reporte final que incluirá la descripción de los resultados de este estudio y un análisis de la calidad de todos los datos y procedimientos requeridos en el protocolo. El reporte final tendrá un formato de artículo científico e incluirá las siguientes secciones: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Figuras y Tablas.

## Croquis. PROTOCOLO # 2 Efectividad biológica y beneficios potenciales del evento MON-00603-6.

- 1a. Isohíbrido convencional, control de maleza manual en caso de ser necesario
- 2a. Isohíbrido convencional, control de maleza químico diferente a glifosato
- 3a. Isohíbrido convencional, con aplicación de glifosato
- 4a. Isohíbrido convencional
- 4b. Híbrido GM, control de maleza manual en caso de ser necesario
- 5a. Isohíbrido convencional
- 5b. Híbrido GM, 1kg Glifosato en etapa V2-V4 + 1kg en etapa V6-V8
- 6a. Isohíbrido convencional
- 6b. Híbrido GM, 2kg Glifosato en etapa V4 a V6
- 7a. Isohíbrido convencional
- 7b. Híbrido GM, 2kg Glifosato en etapa V6 a V8
- 8a. Isohíbrido convencional
- 8b. Híbrido GM, control pre-emergente (recomendación local) y 1kg Glifosato en etapa V6 a V8



No habrá separación entre parcelas, solo entre repeticiones, en el croquis se ha puesto separación solo para efectos de visualización de parcelas

**ANEXO IV. Protocolo 3. Caracterización de Insectos No Blanco en evaluaciones de Maíz GM de Campo en el estado de Chihuahua. (Se incluyen dos eventos, pues la metodología se aplicará simultáneamente en campo para los dos).**

**Protocolo Número:** 3

**Título del Estudio:** Caracterización de Insectos No Blanco en evaluaciones de Maíz GM de Campo en el estado de Chihuahua.

**Responsable:** PHI México SA de CV y Dow AgroSciences de México SA de CV

**Director del Estudio:** Fernando González Cenicerros

**Listado de los nombres e información de contacto de los investigadores responsables de la evaluación. (Los CV se encuentran en el anexo X)**

**Fernando González Ceniceros**

Gerente de Investigación MD  
PHI México, S.A. de C.V.  
Km. 1.6 Poniente  
San Miguel Cuyutlán C.P. 44660  
Mpio. de Tlajomulco de Zuñiga, Jal.  
Tel. (33) 3772-4290  
Fax. (33) 3772-4293  
[fernando.gonzalez@pioneer.com](mailto:fernando.gonzalez@pioneer.com)

**Juan Carlos Martínez Nicolás**

Asociado Senior de Regulación  
PHI México, S.A. de C.V.  
Carr. Guadalajara-Morelia, KM 21-8601-A  
Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.  
CP. 45645. Tel. (33) 3679-7979  
[juan.martinez@pioneer.com](mailto:juan.martinez@pioneer.com)

**Gary D. Thompson**

PG&B insect traits  
Dow AgroSciences  
Tel. 001 (317) 337-4579  
[gdthompson@dow.com](mailto:gdthompson@dow.com)

**Leonel Avilés Morales**

Investigación y Desarrollo  
Dow AgroSciences  
Culiacán, Sin.  
Tel. 667-751-2234 (Móvil)  
[LAVILESMORALES@dow.com](mailto:LAVILESMORALES@dow.com)

## **Regiones en el estado de Chihuahua en donde se solicita realizar la liberación experimental**

### **1. Región Cuauhtemoc**

Coordinado por los investigadores:  
Fernando González Ceniceros

### **2. Región Delicias/Jiménez**

Coordinado por los investigadores:  
Fernando González Ceniceros

#### **1.0 Antecedentes y Objetivo.**

##### **1.1 Antecedentes.**

La integración de cultivos GM en las prácticas agrícolas implica tener el conocimiento de las relaciones ecológicas entre los cultivos, sus parientes silvestres, sus predadores y miembros de las cadenas tróficas con los que interactúan a fin de que su utilización no genere un impacto negativo en el ambiente. Por consiguiente, es importante el determinar el efecto de la proteína *Bt* a plagas no-blanco. Como primer paso, es necesario el obtener información de las plagas presentes en maíces GM.

##### **1.2 Objetivo.**

Identificar las poblaciones de insectos presentes a lo largo del ciclo de cultivo del maíz GM y su control convencional.

#### **2.0 Cumplimiento de los requisitos regulatorios y de control de calidad.**

##### **2.1 Cumplimiento con los requisitos regulatorios.**

Los estudios se llevarán a cabo bajo la supervisión de personal de las empresas y los investigadores mencionados. La siembra de los experimentos se realizará una vez que se cuente con el permiso de liberación al ambiente correspondiente por parte de las autoridades competentes. Los materiales a utilizar son Variedades de Polinización Abierta (VPA's) convencionales y GM con los eventos DAS-01507 y DAS-01507-1x MON-00603-6.

##### **2.2 Requerimientos de control de calidad.**

Se describen las expectativas mínimas de calidad para la realización del estudio y su documentación dentro de estos protocolos.

### 3.0 Duración del estudio.

#### 3.1 Fecha de inicio propuesta: (Ver cuadro 2)

#### 3.2 Fecha de término propuesta: (Ver cuadro 2)

### 4.0 Diseño del estudio.

#### 4.1. Muestreo de Insectos en el Follaje de maíz.

Los datos sobre la presencia de insectos serán obtenidos a partir de los muestreos realizados en parcelas que consistirán de 20 surcos de 5 m de largo y separación entre surcos de 0.8 m para cada material (maíz GM y control). El ensayo será rodeado con un bordo de maíz convencional que consistirá de 4 surcos. El bordo será sembrado siguiendo la misma metodología de establecimiento del experimento y misma fecha. Ejemplo de los insectos a muestrear se incluyen en el cuadro 3.

Cuadro 1. Cantidad de semilla de maíz GM a utilizar en cada localidad:

Tratamiento	Surcos	Metros de siembra/ parcela <sup>(1)</sup>	Semillas / parcela <sup>(2)</sup>	Cantidad en kg <sup>(3)</sup>
DAS-01507-1	20	100	900	0.3
DAS-01507-1 x MON-00603-06	20	100	900	0.3

<sup>(1)</sup> 20 surcos de 5 m cada uno = 100 m

<sup>(2)</sup> 9 semillas/m, 900 semillas/100 m

<sup>(3)</sup> Cantidad en kg (kg) = (Semilla por parcela)/3000 = 0.3 kg (3000 semillas = 1 kg)

Se anexa un croquis representativo del ensayo y se indica el detalle de cada parcela.

Cuadro 2. Localidades, fechas de siembra y cantidad total de semilla requerida para la evaluación de la Efectividad biológica y beneficios potenciales del maíz GM en el estado de Chihuahua.

Sitio propuesto para el programa	Fecha de importación de la semilla (2010)	Fecha límite de siembra (2010)	Superficie		Total de semilla de maíz GM (kg)	
			Superficie total del experimento (m <sup>2</sup> ) <sup>(1)</sup>	Superficie maíz GM (m <sup>2</sup> ) <sup>(2)</sup>	DAS-01507-01	DAS-01507-1 x MON-00603-06
Cuauhtemoc	Marzo	Abril	621 m <sup>2</sup> .	160 m <sup>2</sup> .	0.3	0.3
Delicias/Jiménez	Marzo	Abril	621 m <sup>2</sup> .	160 m <sup>2</sup> .	0.3	0.3
<b>Total</b>			<b>1242</b>	<b>320</b>	<b>0.6</b>	<b>0.6</b>

<sup>(1)</sup> Incluye la parcela con el material a evaluar GM e isohíbrido así como bordos.

<sup>(2)</sup> Superficie maíz GM considerando 20 surcos de 5 m de largo por parcela y los dos eventos, con una separación entre surcos de 0.8 m.

## **4.2. Distancia de Aislamiento.**

Se tendrá una distancia de **300 metros** de aislamiento de cualquier otra parcela donde se siembre maíz ajeno a las parcelas de experimentación. No se considera el desespigue del maíz GM.

### **4.2.1. Muestreo con Sabanas.**

El muestreo con sábanas consiste en un paño blanco que mide aproximadamente de largo 1 m y de ancho el espaciamiento entre hileras. Al sacudir vigorosamente las plantas que se encuentran al lado del paño, los artrópodos caen en el paño. Luego se procederá a la identificación y conteo de estos.

Los insectos pueden ser recogidos para ser identificados en el laboratorio usando una sábana modificada. Para construir la sábana modificada, corte y remueva el centro de una tapadera de plástico de un frasco de colección y péguela al perímetro de un agujero (de dimensiones más pequeñas que la tapadera) localizado en el centro de la sábana. Antes de proceder a la colección de insectos, atornille un frasco a la tapa que fue pegada al centro de la sábana. Las muestras son tomadas extendiendo el paño paralelo a cada hilera y extendiéndolo debajo de las plantas, tomando cuidado para no disturbar las plantas. Cuando se arrodille entre las hileras, extienda cada brazo hacia adelante paralelo a la hilera y doble las plantas sobre el paño. Sacuda las plantas vigorosamente para desalojar los insectos. Recoja los insectos desalojados moviéndolos hacia el agujero del frasco usando un cepillo de pintura suave.

Después de que todos los organismos sean introducidos en el frasco, desenrósquelo y asegúrese de que no se escape ninguno. Vierta una solución de etanol de aproximadamente 70% en el frasco hasta cubrir los insectos y cualquier material de planta que se encuentre en el frasco. Coloque una tapadera en el frasco que contiene la muestra de artrópodos. Ponga una etiqueta en cada frasco con información descriptiva como el nombre de la localidad donde se realizó el muestreo, etapa de desarrollo de la planta, y fecha de la colección de la muestra. Almacene los frascos a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) hasta que se realice la identificación de las muestras de insectos.

Todos los insectos recogidos en los frascos serán contados e identificados como mínimo al nivel de familia. Los organismos comunes de los que se sabe a qué género o especie pertenecen, serán anotados con el nivel taxonómico más alto conocido. La identificación y la enumeración se realizarán con un microscopio de disección.

### **4.2.2. Trampas Amarillas.**

Las trampas amarillas serán utilizadas para determinar la abundancia relativa de insectos de vuelo que no sean capturados en las muestras de sábanas. Ejemplos de

insectos que se encuentran en bajos números en muestreos con sábanas son polinizadores, avispas parasíticas, mariquitas y crisópodos.

Coloque las trampas amarillas al nivel del follaje de las plantas y ajústelos a medida que las plantas vayan creciendo. Cada cartón se monta en una estaca de madera (o similar) colocada entre las hileras en 4 o 6 sitios en el campo de maíz. Coloque y recoja las trampas amarillas dos veces por semana. Ponga una etiqueta en cada trampa con información descriptiva como el nombre de la localidad donde se realizó el muestreo, etapa de desarrollo de la planta, y fecha de la colección de la muestra. Almacene las trampas en el refrigerador (4-9°C) hasta que se proceda a la identificación y enumeración de los artrópodos.

En este método de muestreo, solamente organismos polinizadores, avispas parasíticas, mariquitas y crisópodos serán contados e identificados como mínimo a nivel de familia. Los organismos comunes de los que se sabe a qué género o especie pertenecen, serán anotados con el nivel taxonómico más alto conocido. La identificación y la enumeración se pueden realizar a simple vista, con un microscopio de disección, o con una lupa entomológica.

Datos adicionales de observaciones visuales serán anotados en cada muestreo. El investigador documentará polinizadores, u otros organismos observados en el campo que no se encuentran presente o se encuentran en números bajos en las trampas amarillas o en los muestreos con sábanas.

## **5.0. Resumen de Datos.**

Se preparará un informe final que incluirá descripciones del campo y de las prácticas de mantenimiento, descripciones de los métodos usados, y un sumario de los datos de artrópodos. Los datos de artrópodos serán resumidos por separado para cada localidad, muestreo, y método de muestreo; e incluirá la identificación taxonómica, el grupo funcional, y la abundancia de cada organismo (véase el ejemplo: tabla 1). Ejemplos de grupos funcionales son polinizadores, depredadores, parásitos, o herbívoros.

## **Registros a Conservar.**

### **5.1 Registros del sitio de estudio.**

Además de la información descriptiva del sitio del estudio solicitada en este protocolo se deberá proporcionar información general y actual por el investigador principal. Esta información incluirá lo siguiente:

- i.) Nombre, dirección, ciudad, municipio, estado y teléfono del sitio
- j.) Mapa del sitio indicando el acceso al lugar del estudio desde caminos locales

k.) Diagrama de las parcelas indicando las coordenadas de latitud y longitud de su ubicación (GPS)

l.) Altura sobre el Nivel del Mar

e.) Historial del sitio de estudio de los cinco años previos incluyendo, cultivos anteriores, plaguicidas empleados, caracterización del suelo y cualquier otro dato relevante al estudio. Incluir los datos actuales e históricos del clima.

## **5.2. Disposición del grano cosechado y del material vegetal remanente.**

Describir la disposición del grano y materiales vegetales. Por ejemplo: dentro de una semana de haber colectado el peso de la parcela, la humedad del grano y el dato del peso de prueba, todo el grano cosechado y el material vegetal remanente en las parcelas, caminos y surcos borde deberá ser deshabilitado de acuerdo a los métodos descritos.

## **5.3. Reporte Final.**

El Director de estudio o el designado para ello, prepararán un reporte final que incluirá la descripción de los resultados del estudio sobre la caracterización de organismos no blanco

El reporte Final tendrá un formato de artículo científico e incluirá las siguientes secciones:

Introducción

Materiales y Métodos

Resultados y Discusión

Conclusiones

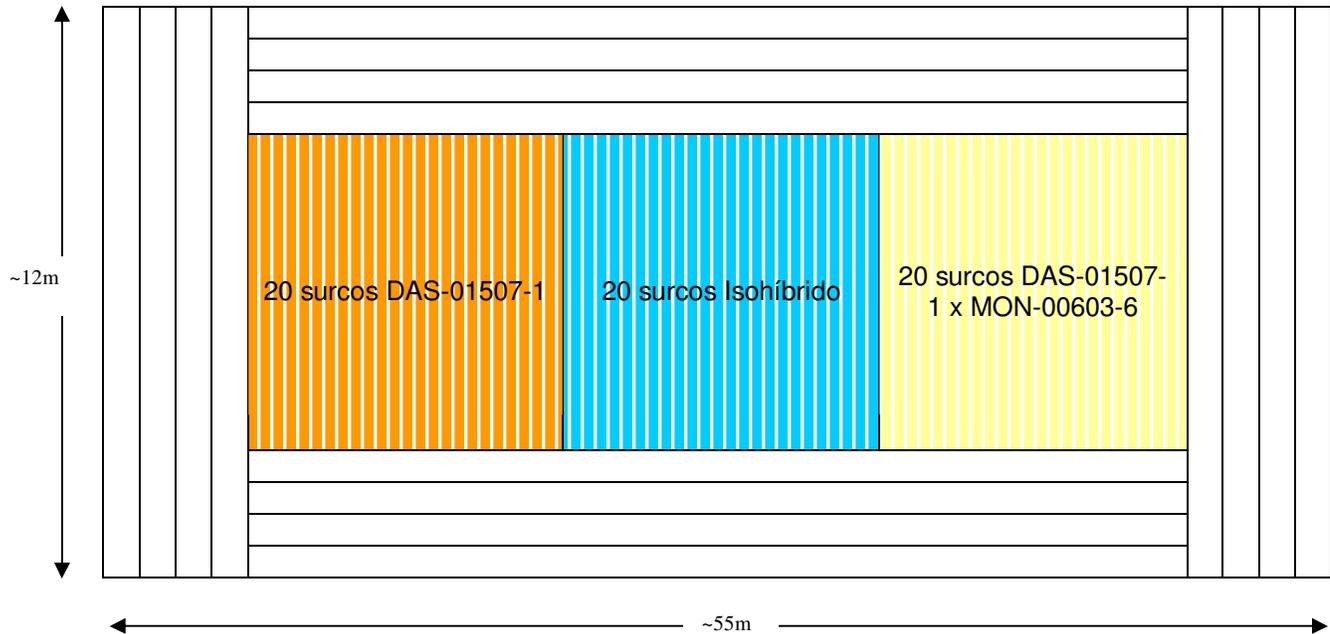
Figuras y

Tablas

## **5.4. Monitoreo Post-Cosecha en búsqueda de plantas Voluntarias.**

Después de la destrucción del cultivo, se establecerá un programa de monitoreo en busca de plantas voluntarias en el siguiente ciclo.

**Croquis. Protocolo # 3. Caracterización de Insectos No Blanco en evaluaciones de Maíz GM de Campo en el estado de Chihuahua. (Se incluyen dos eventos, pues la metodología se aplicará simultáneamente en campo para los dos).**



No habrá espacio entre parcelas, la separación de los eventos se hará a través del isohíbrido convencional.

Ejemplo: Cuadro 3: Localidad 1, Organismos colectados con muestreos de sábanas.

Orden	Familia	Genero-Especie	Grupo Funcional	Abundancia		
				6 nodo	Pico de Florecimiento	Pico de Desarrollo de Cápsulas
Coleóptero	Coccinellidae	<i>Hippodamia variegata</i>	Predador			
		<i>Coccinella septempunctata</i>	Predador			
		Otros	Predador			
	Anthicidae		Carroñero/ Predador			
	Curculionidae	<i>Anthonomus grandis</i>	herbívoro			
Homóptero	Phididae	<i>Aphis gossypii</i>	herbívoro			
Lepidóptero	Noctuidae	<i>Trichopusia ni</i>	herbívoro			
	Gelechiidae	<i>Pectinophora gossypiella</i>	herbívoro			

**ANEXO VI. Método de detección del evento MON-00603-6**



EUROPEAN COMMISSION  
DIRECTORATE GENERAL JRC  
JOINT RESEARCH CENTRE  
INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION  
COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR GM FOOD AND FEED



# **Event-specific method for the quantitation of maize line NK603 using real-time PCR**

## **Protocol**

### **Method development:**

Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences  
(only for the PCR part)

### **Method validation:**

Joint Research Centre – European Commission  
Biotechnology & GMOs Unit

## Contents

<b>1. GENERAL INFORMATION AND SUMMARY OF THE METHODOLOGY.....</b>	<b>4</b>
<b>2. VALIDATION STATUS AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....</b>	<b>5</b>
2.1 GENERAL .....	5
2.2 COLLABORATIVE TRIAL .....	5
2.3 LIMIT OF DETECTION .....	5
2.4 LIMIT OF QUANTITATION.....	5
2.5 MOLECULAR SPECIFICITY.....	6
<b>3. PROCEDURES.....</b>	<b>6</b>
3.1 GENERAL INSTRUCTIONS AND PRECAUTIONS .....	6
3.2 DNA EXTRACTION.....	7
3.3 SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENT OF DNA CONCENTRATION.....	8
<b>3.3.1 Measurement of a reference DNA solution.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3.2 Measurement of a test DNA solution of unknown concentration.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3.3 Evaluation.....</b>	<b>8</b>
3.4 REAL-TIME PCR FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF NK603 MAIZE .....	9
<b>3.4.1 General.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.2 Calibration.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.3 Real-time PCR set-up.....</b>	<b>9</b>
3.5 DATA ANALYSIS .....	11
3.6 CALCULATION OF RESULTS .....	12
<b>4. MATERIALS.....</b>	<b>12</b>
4.1 EQUIPMENT (EQUIVALENTS MAY BE SUBSTITUTED).....	12
4.2 REAGENTS.....	13
4.3 PRIMERS AND PROBES .....	14
<b>5. BUFFERS AND SOLUTIONS.....</b>	<b>14</b>
<b>6. REFERENCES .....</b>	<b>17</b>

<b><u>Document Approval</u></b>		
<b>Name / Function</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>
<b>Marco Mazzara</b> <i>Sector Head</i>	10/01/2005	Signed
<b>Stephane Cordeil</b> <i>Quality Manager</i>	10/01/2005	Signed
<b>Guy Van den Eede</b> <i>B&amp;GMOs Unit Head</i>	10/01/2005	Signed

**Address of contact laboratory:**

European Commission, Joint Research Centre  
Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)  
Biotechnology and GMOs Unit – Community Reference Laboratory  
Via Fermi 1, 21020 Ispra (VA) - Italy

## 1. General information and summary of the methodology

This protocol describes an event-specific real-time quantitative TaqMan<sup>®</sup> PCR procedure for the determination of the relative content of event NK603 DNA to total maize DNA in a sample. The procedure includes the following three modules:

- a) DNA extraction: CTAB DNA extraction and purification protocol
- b) Spectrophotometric quantitation of the amount of total DNA
- c) Quantitative real-time PCR methodology specific for the NK603 event

The PCR assay has been optimised for use in an ABI Prism<sup>®</sup> 7700 sequence detection system. Other systems may be used, but thermal cycling conditions must be verified. The use of 200 ng of template DNA per reaction well is recommended.

DNA is extracted by means of a CTAB DNA extraction and purification protocol. For references, see Murray and Thompson (1980), Wagner *et al.* (1987) and Zimmermann *et al.* (1998). The protocol has been validated for soybeans (Anon, 1998), potato (Anon, 1996) and tomato (Anon, 1999). It has been tested for maize in a multi-laboratory pre-validation. The method was adopted from: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic Acid Extraction. CEN/TC 275/WG11N0031. Draft November 2002.

Subsequently, purified DNA is quantified by means of spectrophotometry in order to determine the amount of DNA to be analysed by means of real-time PCR. The procedure "Basic ultraviolet spectrometric method" has been adopted from the Annex B "Methods for the quantification of the extracted DNA" of the prEN ISO 21571:2002. The method has been widely used and ring-tested (Anon. 2002).

For specific detection of event NK603 genomic DNA, a 108-bp fragment of the region that spans the 3' insert-to-plant junction in maize event NK603 is amplified using two specific primers. PCR products are measured during each cycle (real-time) by means of a target-specific oligonucleotide probe labelled with two fluorescent dyes: FAM as a reporter dye at its 5' end and TAMRA as a quencher dye at its 3' end.

For relative quantitation of event NK603 DNA, a maize-specific reference system amplifies a 70-bp fragment of *adh1*, a maize endogenous gene, using a pair of *adh1* gene-specific primers and an *adh1* gene-specific probe labelled with FAM and TAMRA as described above.

The measured fluorescence signal passes a threshold value after a certain number of cycles. This threshold cycle is called the "Ct" value. For quantitation of the amount of

event NK603 DNA in a test sample, event NK603 and *adh1* Ct values are determined for the sample. Standard curves are then used to calculate the relative content of event NK603 DNA to total maize DNA.

## **2. Validation status and performance characteristics**

### **2.1 General**

The method has been optimised for maize seeds, grain and flour containing mixtures of genetically modified NK603 and conventional maize.

The reproducibility and trueness of the method was tested through collaborative trial using samples of the CRM IRMM-415 series.

### **2.2 Collaborative trial**

The method was validated in a collaborative trial by the Joint Research Centre (JRC) of the European Commission. The study was undertaken with 12 laboratories.

Each participant received ten unknown samples. The samples consist of five reference materials (CRM IRMM-415) of dried maize powder containing mixtures of genetically modified NK603 maize in conventional maize (w/w) between 0.1 % and 4.91 %.

For each unknown sample one DNA extraction has been carried out. Each test sample was analyzed by PCR in four repetitions. The study was designed as a blind duplicate collaborative trial. Each laboratory received each level of GM NK603 in two unknown samples, and the two replicates for each GM level were analyzed in two PCR plates.

A detailed validation report can be found under <http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>

### **2.3 Limit of detection**

According the method developer, the relative LOD of the method is at least 0.05%. The relative LOD was not assessed in a collaborative trial. The lowest relative concentration of the target sequence included in collaborative trail was 0.1%.

### **2.4 Limit of quantitation**

According the method developer, the relative LOQ of the method is 0.1%. The lowest relative concentration of the target sequence included in collaborative trail was 0.1%.

## 2.5 Molecular specificity

The method utilizes the unique DNA sequence at the junction of the insert and the genomic DNA flanking the insert. The sequence is specific to NK603 and thus imparts specificity to the detection method.

The specificity was experimentally tested against DNA extracted from plant materials containing the specific targets of GA21, MON863, MON810 maize, and from conventional corn, Roundup Ready<sup>®</sup> soybean, conventional soybean, Roundup Ready<sup>®</sup> canola, conventional canola and Roundup Ready<sup>®</sup> wheat. None of the materials yielded detectable amplification.

The target sequence is a single copy sequence in the haploid NK603 genome.

## 3. Procedures

### 3.1 General instructions and precautions

- The procedures require experience of working under sterile conditions.
- Maintain strictly separate working areas for DNA extraction, PCR set-up and amplification.
- All the equipment used must be sterilized prior to use and any residue of DNA has to be removed.
- In order to avoid contamination, filter pipette tips protected against aerosol should be used.
- Use only powder-free gloves and change them frequently.
- Clean lab-benches and equipment periodically with 10% sodium hypochloride solution (bleach).
- Pipettes should be checked regularly for precision and calibrated, if necessary.

### 3.2 DNA extraction

- a. Moisten 200 mg of sample with 300 µl of sterile deionised water in a 1.5 ml tube.
- b. Mix with a sterile loop until homogeneity is reached.
- c. Add 700 µl of CTAB-buffer pre-warmed to 65°C; mix with a loop or a clean spatula
- d. Add 10 µl of RNase solution; shake.
- e. Incubate at 65° C for 30 min.
- f. Add 10 µl of Proteinase K solution; mix smoothly.
- g. Incubate at 65° C for 30 min.
- h. Centrifuge for 10 min at 12000 g
- i. Transfer supernatant to a 1.5 ml tube, containing 500 µl chloroform; shake for 30 sec.
- j. Centrifuge for 15 min at 12000 g until phase separation occurs.
- k. Transfer the aqueous upper phase into a new 1.5 ml tube containing 500 µl chloroform; shake.
- l. Centrifuge for 5 min at 12000 g.
- m. Transfer upper layer to a new 1.5 ml tube.
- n. Add 2 volumes of CTAB precipitation solution, mix by pipetting.
- o. Incubate for 60 min at room temperature.
- p. Centrifuge for 5 min at 13000 rpm; discard the supernatant.
- q. Dissolve precipitate in 350 µl NaCl (1.2 M).
- r. Add 350 µl chloroform and shake for 30 sec.
- s. Centrifuge for 10 min at 12000 g until phase separation occurs.
- t. Transfer upper layer to a new reaction tube.
- u. Add 0.6 volumes of isopropanol, mix smoothly by inversion. Incubate for 20 min at room temperature.
- v. Centrifuge for 10 min at 12000 g. Discard the supernatant.
- w. Add 500 µl of 70% ethanol solution and shake carefully.
- x. Centrifuge for 10 min at 12000 g. Discard the supernatant.
- ATTENTION:** drain the supernatant carefully. DNA pellets may detach from the bottom of the tube at this stage.
- y. Dry pellets and re-dissolve DNA in 100µl sterile, TE buffer.
- z. **NOTE:** for thorough homogenisation of the DNA solution, it is recommended to re-suspend the sample by gentle agitation at +4°C for 24 h.

The DNA solution may be stored at ~ 4°C for a maximum of one week, or at -20°C for long-term storage.

### 3.3 Spectrophotometric measurement of DNA concentration

#### 3.3.1 Measurement of a reference DNA solution

The correct calibration of the spectrometer can be verified as follows, with the use of a reference DNA solution:

- a) For blank measurement only dilution buffer is used to fill the measurement vessel.
- b) The reference DNA solution (Calf Thymus or Herring Testes DNA or Lambda DNA) is filled into the measurement vessel.

Absorption is measured for both blank and reference DNA solutions at  $\lambda = 260$  nm and  $\lambda = 320$  nm.

#### 3.3.2 Measurement of a test DNA solution of unknown concentration

- a) Blank measurement: mix the dilution buffer with a 2M sodium hydroxide solution, at the final NaOH concentration of 0.2M. This solution is used for the blank measurement.
- b) Mix the DNA solutions with a 2M sodium hydroxide solution and, if needed, with dilution buffer, at the final NaOH concentration of 0.2M.
- c) Measure the absorption after 1 min incubation time for both blank and reference DNA solution at  $\lambda = 260$  nm and  $\lambda = 320$  nm. The reading is stable for at least 1 h.

Example for blank measurement: Mix 90  $\mu$ l dilution buffer and 10  $\mu$ l of 2M sodium hydroxide solution and transfer to a 100  $\mu$ l measurement vessel.

Example for the test DNA solution: Mix 80  $\mu$ l of dilution buffer or water, 10  $\mu$ l of 2M sodium hydroxide solution, 10  $\mu$ l of DNA solution of unknown concentration and transfer to a 100  $\mu$ l measurement vessel.

#### 3.3.3 Evaluation

The absorption (OD) at 320 nm (background) is subtracted from the absorption at 260 nm resulting in the corrected absorption at 260 nm. If the corrected OD at 260 nm equals to 1, then the estimated DNA concentration is 38  $\mu$ g/ml for single stranded DNA (denatured with sodium hydroxide).

Reliable measurements require OD values at  $\lambda=260$  nm greater than 0.05.

The concentration of the double stranded test DNA solution is finally calculated taking into consideration the denaturation and the dilution factor applied.

### **3.4 Real-time PCR for quantitative analysis of NK603 maize**

#### **3.4.1 General**

The PCR set-up for the taxon specific target sequence (*Adh1*) and for the GMO (NK603) target sequence should be carried out in separate vials. Multiplex PCR (using differential fluorescent labels for the probes) has not been tested or validated.

The use of 200 ng of template DNA per reaction well is recommended.

The method is developed for a total volume of 50  $\mu$ l per reaction mixture with the reagents as listed in Table 1.

#### **3.4.2 Calibration**

Separate calibration curves with each primer/probe system are generated in the same analytical amplification run.

The calibration curves consist of five dilutions of DNA extracted from the 4.91 % CRM IRMM-415. A series of one to three dilution intervals (one to four for the last two dilutions) at a starting concentration of 110,092 maize genome copies may be used (corresponding to 300 ng of DNA with one maize genome assumed to correlate to 2.725 pg of haploid maize genomic DNA) (Arumuganathan & Earle, 1991).

A calibration curve is produced by plotting Ct-values against the logarithm of the target copy number for the calibration points. This can be done e.g. by use of spreadsheet software, e.g. Microsoft Excel, or directly by options available with the sequence detection system software.

The copy numbers measured for the unknown sample DNA is obtained by interpolation from the standard curves.

#### **3.4.3 Real-time PCR set-up**

1. Thaw, mix gently and centrifuge the required amount of components needed for the run. **Keep thawed reagents at 1-4°C on ice.**

- In two reaction tubes (one for NK603 system and one for the *adh1* system) on ice, add the following components (Table 1) in the order mentioned below (except DNA) to prepare the master mixes.

Table 1. Amplification reaction mixtures in the final volume/concentration per reaction well, for NK603/*adh1* specific systems.

<b>Component</b>	<b>Final concentration</b>	<b>µl/reaction</b>
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)	1x	25 µl
Primer NK603-F/ <i>adh1</i> -F	150 nM	-
Primer NK603-R/ <i>adh1</i> -R	150 nM	-
Probe NK603/ <i>adh1</i>	50 nM	-
Nuclease free water		up to 50 µl
Template DNA (maximum 300 ng, see 3.4.1 and 3.4.2)		5 µl
<b>Total reaction volume:</b>		<b>50 µl</b>

- Mix gently and centrifuge briefly.
- Prepare two 1.5 ml reaction tubes (one for the NK603 and one for the *adh1* master mix) for each DNA sample to be tested (standard curve samples, unknown samples and control samples).
- Add to each reaction tube the correct amount of master mix (e.g. 45 x 3 = 135 µl master mix for three PCR repetitions). Add to each tube the correct amount of DNA (e.g. 5 x 3 = 15 µl DNA for three PCR repetitions). Low-speed vortex each tubes at least three times for approx 30 sec. This step is mandatory to reduce the variability among the repetitions of each sample to a minimum.
- Spin down the tubes in a micro-centrifuge. Aliquot 50 µl in each well. Seal the reaction plate with optical cover or optical caps. Centrifuge the plate at low speed (e.g. approximately 250 x *g* for 1 minute at 4 °C to room temperature) to spin down the reaction mixture.
- Place the plate into the instrument.
- Run the PCR with cycling conditions described in Table 2:

**Table 2.** Reaction conditions.

Step	Stage	T°C	Time (sec)	Acquisition	Cycles
1	UNG pre-PCR decontamination	50 °C	120"	No	1x
2	Activation of DNA polymerase and denaturation	95 °C	600"	No	1x
3	Denaturation	95 °C	15"	No	45x
4	Amplification Annealing & Extension	60 °C	60"	Measure	

### 3.5 Data analysis

Subsequent to the real-time PCR, analyse the run following the procedure below:

a) Set the threshold: display the amplification curves of one system (e.g. *adh1*) in logarithmic mode. Locate the threshold line in the area where the amplification profiles are parallel (exponential phase of PCR) and where there is no "fork effect" between repetitions of the same sample. Press the update button to ensure changes affect Ct values. Switch to the linear view mode by clicking on the Y axis of the amplification plot, and check that the threshold previously set falls within the geometric phase of the curves.

b) Set the baseline: determine the cycle number at which the threshold line crosses the first amplification curve and set the baseline three cycles before that value (e.g. earliest Ct = 25, set the baseline crossing at Ct = 25 – 3 = 22).

c) Save the settings

d) Repeat the procedure described in a) and b) on the amplification plots of the other system (e.g. NK603 system).

e) Save the settings and export all the data into an Excel file for further calculations.

### 3.6 Calculation of results

After having defined a threshold value within the logarithmic phase of amplification as described above, the instruments software calculated the Ct-values for each reaction.

The standard curves are generated both for the *adh1* and NK603 specific system by plotting the Ct-values measured for the calibration points against the logarithm of the DNA copy numbers, and by fitting a linear regression line into these data.

Thereafter, the standard curves are used to estimate the copy numbers in the unknown sample DNA by interpolation from the standard curves.

For the determination of the amount of NK603 DNA in the unknown sample, the NK603 copy number is divided by the copy number of the maize reference gene (*adh1*) and multiplied by 100 to obtain the percentage value ( $GM\% = NK603/adh1 * 100$ ).

## 4. Materials

### 4.1 Equipment (equivalents may be substituted)

DNA extraction:

- Water bath or heating block
- Microcentrifuge
- Micropipettes
- Vortexer
- 1.5/2.0 ml tubes
- Tips and filter tips for micropipettes
- Rack for reaction tubes
- Vinyl or latex gloves
- Optional: vacuum dryer apt to dry DNA pellets

Spectrophotometry:

- UV spectrophotometer. Single beam, double beam or photodiode array instruments are suitable.
- Vortexer
- Measurement vessels. e.g. quartz cuvettes or plastic cuvettes suitable for UV detection at a wavelength of 260 nm. The size of the measurement vessels used determines the volume for measurement. This should be one of the following: half

micro cuvettes (1000  $\mu$ l), micro cuvettes (400  $\mu$ l), ultra micro cuvettes (100  $\mu$ l) and quartz capillaries (3  $\mu$ l to 5  $\mu$ l). The optical path of standard cuvettes is usually 1 cm.

#### Real-time PCR:

- ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System. Applied Biosystems Part No 7700-01-200/208.
- ABI Prism<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System. Applied Biosystems Part No 4329002 or 4329004.
- Software: Sequence Detection System version 1.7 (Applied Biosystems Part No 4311876) or equivalent versions.
- MicroAmp<sup>®</sup> optical 96-Well reaction plates. Applied Biosystems Part No N801-0560).
- MicroAmp<sup>®</sup> optical adhesive covers. Applied Biosystems Part No 4311971.
- MicroAmp Optical caps. Applied Biosystems Part No. No 801-0935.
- Microcentrifuge
- Micropipettes
- Vortex
- Rack for reaction tubes
- 1.5/2.0 ml tubes

## 4.2 Reagents

#### DNA extraction:

- CTAB: Cetyltrimethylammonium Bromide (Ultrapure grade)
- TRIS: Tris[hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride (Molecular Biology grade)
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt (titration 99.9%)
- Ethanol (96% at least)
- Isopropanol (99.7% at least)
- Chloroform (99% at least)
- NaCl (99% at least)
- NaOH (98% at least, anhydrous)
- Distilled sterile water
- RNase A solution 10 mg/ml
- Proteinase K solution 20 mg/ml

#### Spectrophotometry:

- Dilution buffer: TRIS: Tris[hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride (Molecular Biology grade). 10 mM, pH 9.0.
- NaOH (98% at least, anhydrous)

- Hydrochloric acid (HCl),  $\varphi$  (HCl) = 37 %
- Herring Testes DNA, Calf Thymus DNA, or Lambda DNA

Real-time PCR:

- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X). Applied Biosystems Part No 4304437

### 4.3 Primers and Probes

Name	Oligonucleotide DNA Sequence (5' to 3')
<i>GMO target sequence</i>	
NK603 primer F	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA
NK603 primer R	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT
NK603 probe	6-FAM- TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC-TAMRA
<i>Reference gene target sequence</i>	
<i>Adh1</i> primer F	CCAGCCTCATGGCCAAAG
<i>Adh1</i> primer R	CCTTCTTGGCGGCTTATCTG
<i>Adh1</i> probe	6-FAM-CTTAGGGGCAGACTCCCCTGTTCCCT-TAMRA

## 5. Buffers and Solutions

The following describes the preparation, storage and stability of the buffers used in this procedure. Volume may be scaled as needed. Equivalent reagent may be substituted.

DNA extraction:

- **CTAB buffer (1 litre)**

Weight and mix in an appropriate cylinder:

20 g/l CTAB	20 g
1.4 M NaCl	82 g
0.1 M Tris-HCl	15.75 g
20 mM Na <sub>2</sub> EDTA	7.5 g

- Add 500 ml of sterile distilled water.
- Adjust pH to a value of 8.0 with 1M NaOH.
- Fill up to 1000 ml and autoclave.

Store at 4° C for up to 6 months.

- **CTAB-precipitation solution (200 ml)**

Weight and mix in an appropriate cylinder:

5 g/l CTAB	1 g
0.04 M NaCl	0.5 g

- Add 100 ml of distilled water.
- Adjust pH to a value of 8.0 with 1 M NaOH.
- Fill up to 200 ml and autoclave.

Store at 4° C for up to 6 months.

- **NaCl 1.2 M (100 ml)**

- Dissolve 7 g of NaCl in 100 ml sterile distilled water in a cylinder.
- Autoclave

Store at room temperature for up to 5 years

- **Ethanol-solution ~70 % (v/v) (100 ml)**

- Mix 70 ml of pure ethanol with 30 ml of sterile distilled water

Store at room temperature or at -20° C for up to 5 years

- **NaOH 1M (50 ml)**

- Dissolve 2 g of NaOH in 50 ml of sterile water in a cylinder or a 50 ml conical tube.

Store at room temperature for up to 6 months

- **TE buffer, pH 7.0 (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0) (250 ml)**

- Mix 100 ml of nuclease-free water, 2.5 ml of 1M Tris, pH 8.0 and 0.5 ml of 0.5M EDTA
- Adjust pH to 7.0 with HCl
- Adjust final volume to 250 ml with nuclease-free water
- Filter sterilise

Store at room temperature for up to 5 years

- **RNase A 10 mg/ml**

- Dissolve the RNase A at a final concentration of 10 mg/ml in sterile water.
- If indicated by supplier: boil the RNase A solution at 95°C for 15' to remove any residual nuclease activity.
- Aliquot solution as appropriate (thawing and re-freezing should be avoided)

Store aliquots at -20° C for up to 6 months

- **Proteinase K 20 mg/ml**

- a. Dissolve the Proteinase K at a final concentration of 20 mg/ml in sterile distilled water according to the supplier specifications.
- b. Aliquot solution as appropriate (thawing and re-freezing should be avoided)

Store aliquots at -20° C for up to 6 months

Spectrophotometry:

- **Reference DNA solution**

A DNA 10 mg/ml stock solution is prepared by dissolving 100 mg DNA (from Herring Testes or from Calf Thymus or Lambda DNA) in 10 ml dilution buffer (TRIS/HCl 10 mM, pH 9.0). At this concentrations DNA dissolves and homogenises slowly and the resulting solution is very viscous. The stock solution is further diluted with dilution buffer up to the desired working concentration (e.g. 25 µg/ml).

- **NaOH 2M (50 ml)**

- a. Dissolve 4 g of NaOH in 50 ml of sterile water in a cylinder or a 50 ml conical tube.

Store at room temperature for up to 5 years

## 6. References

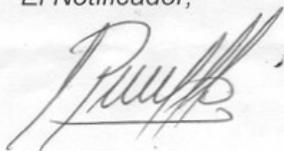
- Anon. 1996. Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Kartoffeln durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde. L 24.01-01, February 1996, revised in January 1997.. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV. Loseblattausgabe, Stand Jan 1997 Bd.1. Berlin, Köln. Beuth Verlag GmbH.
- Anon 1998. Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Sojabohnen durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde. L 23.01.22-1, March 1998. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV. Loseblattausgabe, Stand March 1998 Bd.1. Berlin, Köln. Beuth Verlag GmbH.
- Anon. 1999. Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Tomaten durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde L 25.03.01-1, November 1999. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV. Loseblattausgabe, Stand Nov 1999 Bd.1. Berlin, Köln. Beuth Verlag GmbH.
- Anon. 2002. Swiss food manual, Chapter 52B, Section 1 to 5. Eidgenössische Drucksachen und Materialzentrale, CH-5005 Bern. Available on CD.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D. (1991). Nuclear content of some important plant species. *Plant Mol Biol Reporter* 9, 208-218.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 4321–4325.
- Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghay-Marroof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. and Allard, R.W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84, 2097–2100.
- Zimmermann, A., Lüthy, J. and Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 207, 81–90.

**ANEXO VII. Resolución ICA 464/7**

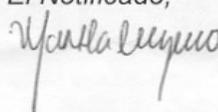
**NOTIFICACIÓN PERSONAL**

En Bogotá, a - 9 MAR. 2007 , notifiqué personalmente e hice entrega de la Resolución 464 del 26 de febrero de 2007, "por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)", al doctor GUILLERMO HEINS FINKENSTEADT, identificado con cédula de ciudadanía 7.444.222 expedida en ....., en representación de la sociedad DuPONT DE COLOMBIA S.A.

El Notificador,



El Notificado,



*Protección agropecuaria,  
nuestro compromiso por la paz*

RESOLUCIÓN No.  
( 00464 )

26 FEB 2007

por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)

EL GERENTE GENERAL DEL INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, ICA

en uso de sus facultades legales y en especial por las conferidas por los Decretos 2141 de 1992, 1840 de 1994 y 4525 de 2005, y

CONSIDERANDO:

Que el Decreto 2141 de 1992, dictado por el Presidente de la República, por mandato directo del artículo transitorio 20 de la Constitución Pública de Colombia de 1991, asignó al Instituto Colombiano Agropecuario, ICA entre otras funciones, la de prevenir los riesgos biológicos, sanitarios y químicos para las especies animales y vegetales;

Que la Ley 101 de 1993 en su artículo 65, modificado por el artículo 112 del Decreto 2150 de 1995, asignó al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, por medio del ICA, la función de desarrollar políticas y planes de protección a la producción y productividad agropecuaria, y la responsabilidad de ejercer acciones para minimizar los riesgos alimentarios y ambientales que provengan del empleo de los insumos agropecuarios, lo mismo que para promover la producción y productividad agropecuaria;

Que el Convenio de las Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica, denominada "Ley global en Biodiversidad", se adoptó el 5 de junio de 1992 y fue ratificada por Colombia mediante la Ley 165 de 1994, la cual fue declarada exequible por la H. Corte Constitucional mediante Sentencia C-519 de 1994;

Que el Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología se aprobó el 29 de enero de 2000 y fue ratificado por Colombia mediante Ley 740 de 2002; la cual fue declarada exequible por la H. Corte Constitucional mediante la Sentencia C-071 de 2003;

Que el gobierno nacional, en desarrollo de la Ley 740 de 2002 expidió el Decreto 4525 de 2005, y designó al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a través del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA la competencia para la autorización de movimientos transfronterizos, el tránsito, la manipulación y la utilización de los Organismos Vivos Modificados, OVM con fines agrícolas, pecuarios, pesqueros, plantaciones forestales comerciales y agroindustriales que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica;

Que es función del ICA adoptar, de acuerdo con la ley y las demás normas mencionadas, las medidas necesarias para hacer efectivo el control de la sanidad animal, vegetal y la prevención de los riesgos biológicos y químicos así como la de ejercer el control técnico de la producción y comercialización de los insumos agropecuarios y semillas que puedan constituir riesgo para la producción y sanidad agropecuaria;

Que el Decreto 4525 de 2005 estableció el marco regulatorio de los Organismos Vivos Modificados, OVM de acuerdo con los procedimientos señalados en la Ley 740 de 2002 y

RESOLUCIÓN No.  
( 00464 )

26 FEB 2007

por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)

creó el Comité Técnico Nacional de Bioseguridad, CTNBio para OVM con fines agrícolas, pecuarios, pesqueros, plantaciones forestales comerciales y agroindustria cuya función es, entre otras recomendar al Gerente General del ICA la expedición del acto administrativo para la autorización de actividades solicitadas con organismos vivos modificados;

Que la empresa Du Pont de Colombia S.A., en el marco de la legislación vigente, solicitó autorización al ICA para introducir, producir y comercializar en Colombia el maíz con la tecnología Bt Herculex I (TC-1507), desarrollado conjuntamente entre Dow AgroSciences y Pioneer Hi-Bred Internacional Inc., a partir de una proteína natural de **Bacillus thuringiensis** - Bt, de nombre Cry1F. El producto también presenta tolerancia al glufosinato;

Que el maíz con la tecnología Bt Herculex I (TC-1507) contiene el gen Cry 1F que codifica la síntesis de pequeñas cantidades de proteína Cry1F en los tejidos de la planta de maíz proveyéndole protección contra insectos lepidópteros;

Que la solicitud fue analizada por el CTNBio el cual recomendó que se adelantaran estudios de bioseguridad con maíz con la tecnología Herculex I ® (TC-1507) en las zonas maiceras del país, con el objetivo de determinar el transporte del polen del híbrido de maíz con tecnología Herculex I ® (TC-1507); los efectos de la proteína Cry1F sobre los artrópodos no objetivo presentes en regiones maiceras de Colombia; el efecto de la proteína Cry1F sobre insectos lepidópteros en el cultivo del maíz y la evaluación de la eficacia del gen con la tecnología Herculex I (TC-1507) con resistencia a glufosinato de amonio en maíz;

Que en Colombia se realizaron los estudios de bioseguridad en el 2006, en el departamento de Córdoba y de acuerdo con los resultados de estos ensayos, no hubo efecto negativo de la tecnología Herculex I (TC-1507) sobre el agroecosistema donde se desarrollaron los estudios;

Que en las sexta y séptima sesiones del Comité Técnico Nacional de Bioseguridad CTNBio, llevadas a cabo el 31 de enero y el 23 de febrero de 2007 respectivamente, se presentaron los resultados obtenidos en los estudios de bioseguridad realizados del flujo genético de maíz modificado genéticamente hacia convencional en el departamento de Córdoba; "la evaluación de la eficacia del gen con la tecnología Herculex I con resistencia a glufosinato de amonio en maíz"; la evaluación del efecto de la tecnología Herculex I (TC-1507) sobre poblaciones de artrópodos en el cultivo del maíz en la subregión Caribe húmedo colombiano, habiéndose encontrado en todos los experimentos realizados, que la mayoría del polen marcador amarillo se depositó en las mazorcas blancas que estuvieron en los primeros 50m a partir de la fuente de polen, siendo los resultados consistentes con lo encontrado en otros países donde se ha evaluado el flujo de polen de maíz bien sea genéticamente modificado o convencional, el viento deposita el polen en mayor porcentaje a 25-50m de la fuente por lo que no se considera que genere contaminación mas allá de lo normal sobre cualquier otro tipo de maíz incluyendo materiales silvestres que se pudiesen encontrar en la vecindad;

RESOLUCIÓN No.  
( 00464 )

26 FEB 2007

*por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)*

*Que el análisis global de los resultados lleva a concluir que cuando se aplica en forma total el herbicida sobre el cultivo como se verifico con el híbrido Herculex I tolerante al herbicida, se alcanzaron porcentajes de control de malezas entre 80 y 99 por ciento, dependiendo del número de aplicaciones y la dosis aplicada;*

*Que se pudo establecer que no ocurrió un daño evidente, en las condiciones en que se realizó el estudio, que pudiera afectar el rendimiento del cultivo. Los resultados indican que la aplicación del herbicida glufosinato de amonio tanto en maíces con el gen de resistencia como en maíces convencionales no afecta las características agronómicas del cultivo, como lo señala la comparación de medias para los diferentes caracteres agronómicos estudiados entre métodos de aplicación. De la misma forma las características agronómicas entre maíces con el gen del glufosinato y maíces convencionales no muestran diferencias;*

*Que todo lo anterior sugiere una alta eficacia del herbicida para control de malezas y de la misma forma una alta eficiencia del gen para inducir tolerancia al cultivo de manera que las aplicaciones se pueden realizar en diferentes etapas del cultivo y con diferentes dosis según lo requieran las condiciones prevalentes sin afectar ninguna de las características agronómicas importantes, por lo tanto esta tecnología cuando se decida su liberación comercial, por bioseguridad, además de tener un plan de manejo para insectos lepidópteros deberá tener un plan para el manejo de herbicidas;*

*Que la tecnología Herculex I (TC-1507) en los estudios que se adelantaron sobre artrópodos no presentó efecto negativo alguno sobre las poblaciones naturales de la mesofauna del suelo que se capturaron en muestras de suelo y que no son objetivo de la tecnología;*

*Que se puede afirmar que los datos son altamente confiables y consistentes con lo observado por la mayoría de otros investigadores que han adelantado experimentos similares;*

*Que en la séptima sesión del Comité Técnico Nacional de Bioseguridad, CTNBio realizada el 23 de febrero de 2007 se analizó la situación del cultivo del maíz en Colombia, los problemas de calidad y costos que se están presentando, junto con las grandes proyecciones que tiene esta gramínea en el campo de los biocombustibles, así como la posibilidad de que se disponga de nuevas y mejores tecnologías que permitan mayor margen de ganancia para el productor y para el país;*

*Que el cultivo del maíz en los últimos años ha alcanzado una gran importancia en el ámbito nacional e internacional debido a la oportunidad de utilizar esta especie en la producción de biocombustibles y en el caso colombiano, este cultivo se ve afectado por problemas sanitarios que inciden en la producción haciendo perder competitividad y sostenibilidad;*

*Que la producción de biocombustibles a partir de vegetales se encuentra entre los principales medios para combatir el cambio climático, propósito internacional adoptado por un importante grupo de países a través del Protocolo de Kyoto, que contempla ventajas y*

forma 4-027

RESOLUCIÓN No.  
( 00464 )

26 FEB 2007

por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)

ayudas financieras de la comunidad internacional para los países y entidades que lo implementen;

Que el fomento de la producción de biocombustibles a partir de vegetales en Colombia representa para el país disminución de la dependencia del país de los combustibles fósiles (importaciones), beneficios ambientales ya que son productos biodegradables, el 85 por ciento se degrada en aproximadamente 28 días, lo cual representa una reducción en los niveles de contaminación;

Que la Agencia Internacional de Energía, IEA predice que el etanol tiene el potencial de suplir el 10 por ciento de la gasolina utilizada en el mundo para el año 2025 y el 30 por ciento en 2050, comparado con el 2 por ciento del año 2005;

Que actualmente, el etanol se produce de una gran variedad de productos agrícolas como caña, maíz, remolacha, trigo, cebada, yuca, entre otros; sin embargo, la producción mundial se basa principalmente en la caña de azúcar (Brasil) y el maíz (Estados Unidos);

Que Colombia demanda alrededor de 3,5 millones de toneladas de maíz, de las cuales importa 2 millones principalmente de Estados Unidos;

Que entre las plagas de mayor importancia económica para este cultivo están el **Spodoptera** y **Diatraea saccharalis**, conocida esta última como el "barrenador del tallo" que es una de las plagas más importantes del cultivo de maíz ya que este insecto ocasiona, en promedio, pérdidas de un 30 por ciento de la producción de maíz. Otra plaga de gran importancia en algunas áreas del país es el complejo **Heliothis virescens** y **H. zea** que en algunos casos llega a afectar el 20 por ciento de la producción de mazorcas, trayendo todos estos insectos altos costos por el concepto del control de plagas y por consiguiente, bajos rendimientos del cultivo de maíz y daños ambientales por el uso excesivo de plaguicidas químicos, lo que no permite que el agricultor sea competitivo en el mercado nacional y el país se inserte en el mercado internacional;

Que el agricultor maicero colombiano invierte entre una y dos aplicaciones de insecticida por ciclo de cultivo en el control de **Spodoptera** y otros insectos plaga de incidencia temprana en el cultivo. En la mayoría de los casos, el agricultor hace nada respecto a la incidencia de **Diatraea** el cual causa daños y pérdidas al cultivo que poco se cuantifican porque se dan hacia el final del ciclo de cultivo e irregularmente, porque muchos lotes se inspeccionan poco en tal estado y porque los ataques de **Diatraea** son poco evidentes a menos que causen volcamiento apreciable y/o se inspeccionen las plantas con detenimiento;

Que en general, se hacen tres aplicaciones por año contra ataques de insectos en estado temprano de desarrollo del maíz por año de cultivo, incluido el **Spodoptera**, y se estima que la mitad de esas aplicaciones las ahorrará con el uso de maíz modificado genéticamente contra **Spodoptera**, lo cual implica beneficios al agricultor al reducir el costo de producción y al ambiente en general al fomentar un uso racional de insecticidas en el campo;

forma 4-027

RESOLUCIÓN No.  
( 00464 )

26 FEB 2007

por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)

Que el maíz resistente a insectos plaga (maíz Bt) lo sembraron por vez primera los agricultores en el año de 1996 en los Estados Unidos y Canadá. Argentina y España comenzaron a plantar maíz Bt en 1998 seguidos por Sudáfrica en el año 2000 y las Filipinas en el año 2003. En el 2004, Uruguay y Honduras comenzaron la siembra comercial del maíz Bt;

Que el principal impacto del maíz Bt ha sido el de un incremento del rendimiento (5%-25%) debido a una mejor protección contra las plagas de insectos que atacan al cultivo. Esto ha dado como resultado beneficios económicos significativos para los agricultores. En algunos países como España, además del incremento en rendimiento, el maíz Bt ayudó a reducir los costos de producción, dando como resultado ganancias económicas del orden de \$112 dólares por hectárea. En términos globales, el valor neto para los agricultores que sembraron maíz Bt fue superior a los \$400 millones de dólares en el 2004 y el acumulado, a partir del año 1996, supera los 1,900 millones de dólares;

Que los cultivos de maíz Bt también han generado beneficios ambientales significativos. Desde que el maíz Bt fue introducido por primera vez en los Estados Unidos en el año 1996, el volumen promedio de uso de insecticidas ha disminuido en 1 millón de kg de i.a. (ingrediente activo) lo que representa un 11% del total. En Canadá se tienen reducciones similares. En España, el uso de insecticidas ha disminuido en un 32% desde 1998. En algunos países como Argentina, donde tradicionalmente se utilizan muy escasamente los insecticidas en la producción de maíz, la reducción de insecticidas fue pequeña pero el beneficio por adopción del maíz Bt se observa en el incremento del rendimiento debido a un mejor control de los insectos;

Que en el conjunto de países que sembraron maíz Bt durante 2004, el resultado neto fue de una reducción del 10 por ciento en el volumen de insecticidas utilizado (1.2 millones de Kg de i.a.) y una reducción del 11 por ciento en el impacto ambiental;

Que el maíz tolerante a herbicida se sembró comercialmente por vez primera en 1997 en los Estados Unidos y Canadá. Sudáfrica comenzó a plantar maíz tolerante a herbicida en el año 2003 y fue seguida por Argentina en el año 2004;

Que en los Estados Unidos y Canadá el principal beneficio del maíz tolerante a herbicida ha sido la reducción en los costos de producción como resultado de la disminución en el costo del control de la maleza. Esto ha permitido aumentar de manera significativa el beneficio económico de los agricultores entre \$21 a \$45 dólares por hectárea. En términos globales, el maíz tolerante a los herbicidas generó un importante aumento en los ingresos y beneficios ambientales;

Que los agricultores que plantan maíz tolerante a herbicida emplean un programa para el control de maleza diferente al utilizado por los agricultores que siembran maíz convencional. Los cambios en tipo de herbicidas y dosis requeridas han dado como resultado una reducción total en el volumen de herbicidas que se utilizan en el maíz tolerante a herbicida

RESOLUCIÓN No.  
( 00464 )

26 FEB 2007

por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)

en comparación con el maíz que no es tolerante a los herbicidas. Del mismo modo, ha habido una reducción total del impacto ambiental que se asocia con el uso de herbicida en los cultivos de maíz tolerante a herbicida. Estos cambios son muy significativos ya que reducen el impacto ambiental de la agricultura y reducen la exposición de los agricultores y de la fauna silvestre;

Que las anteriores bondades de la tecnología Herculex I justifican su valoración para uso agrícola en Colombia;

Que teniendo en cuenta lo anterior, el CTNBio, del cual hacen parte los Ministerios de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial; de la Protección Social; de Agricultura y Desarrollo Rural; Colciencias y el ICA, por consenso concluyó que desde el punto de vista técnico y científico y con los elementos de orden económico y social expuestos, se puede recomendar al ICA autorizar siembras controladas de maíz con la tecnología Herculex (TC 1507), de acuerdo con la demanda por parte de agricultores que tiene que estar soportada por la compañía titular de la tecnología y obviamente, aplicando estrictamente un Plan de bioseguridad y manejo para esta tecnología;

Que estas siembras se deben realizar en el área de influencia donde se adelantaron los estudios de bioseguridad (Caribe húmedo), exceptuando áreas de resguardos indígenas y dejando como mínimo 300 metros de distancia de cultivos de maíces convencionales. El uso de la cosecha de estas siembras estará dirigido a la alimentación directa o procesamiento para consumo animal, y consumo humano, de acuerdo con las autorizaciones que tienen para esos fines, quedando prohibido conservar, guardar, intercambiar y/o vender cualquiera semilla con el fin de utilizarlas para siembra,

Que en virtud de lo anterior:

**RESUELVE:**

**ARTÍCULO 1.-** Autorizar al representante legal de Du Pont de Colombia S.A., NIT 890.100.454-9, (señor Guillermo Heins Finkensteadt), la importación de semillas de Maíz con la tecnología Herculex I (TC 1507) para siembras controladas en la zona agroecológica del Caribe húmedo.

**PARÁGRAFO.** Las semillas que se importen deberán cumplir con los estándares de calidad establecidos en el país para la especie maíz y categoría de semillas, así como con los requisitos fitosanitarios y toda norma sobre empaques y-o envases, rotulado, etiquetas y marbetería establecidos en la Resolución ICA 148 de 2005.

**ARTICULO 2.-** Que las siembras se harán de acuerdo con la demanda por parte de agricultores que tienen que estar soportadas por la Compañía titular de la tecnología.

RESOLUCIÓN No.  
( 00464 )

26 FEB 2007

por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)

PARAGRAFO. Para autorizar las cantidades a importar la compañía deberá enviar al ICA, antes de cada cosecha, un listado de los agricultores interesados en realizar las siembras señalando ubicación del predio y área a sembrar. Las siembras no se podrán hacer en áreas de resguardos indígenas y siempre dejando como mínimo 300 metros de distancia de cultivos de maíces convencionales. El ICA podrá no autorizar siembras dependiendo del caso.

ARTICULO 3. El uso de híbridos de maíz con la tecnología Herculex I (TC 1507) contará con un Plan de bioseguridad y manejo, el cual contiene todas las medidas de bioseguridad previstas para el uso de esta nueva tecnología.

PARÁGRAFO. El uso de la cosecha de estas siembras estará dirigido a la alimentación directa o procesamiento para consumo animal, y consumo humano, de acuerdo con las autorizaciones que tienen para esos fines, quedando prohibido conservar, guardar, intercambiar y/o vender cualquiera semilla con el fin de utilizarlas para siembra.

ARTICULO 4.- La sociedad Du Pont de Colombia S.A. queda obligada a realizar seguimiento a la tecnología cumpliendo lo estipulado en el plan de bioseguridad y manejo, enviando al ICA informes bimensuales de todas las acciones exigidas en el seguimiento a la tecnología.

ARTICULO 5.- Las siembras que se hagan con los híbridos de maíz con la tecnología Herculex I (TC 1507) deben cumplir las normas establecidas para la producción, importación, exportación, distribución y comercialización de semillas para siembra en el país consignadas en las Resoluciones ICA 148 del 18 de enero de 2005, 946 de 2006 y demás normas vigentes sobre la materia.

ARTÍCULO 6.- El incumplimiento de lo previsto en la presente Resolución, en las demás normas que rigen la materia y las acciones que el ICA ordene en ejercicio de su función de seguimiento y control, dará lugar a la aplicación de las sanciones previstas por el Decreto 1840 de 1994, sin perjuicio de las acciones penales y civiles que correspondan.

ARTICULO 7.- En aplicación del principio de precaución o por razones de bioseguridad, cuando el ICA lo estime necesario, podrá destruir todo el material que contenga la tecnología Herculex I (TC 1507) sin derecho a indemnización y sin consentimiento previo del titular.

ARTÍCULO 8.- La presente Resolución rige a partir de la fecha de su expedición.

COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE.

Dada en Bogotá, a

  
ANDRÉS VALENCIA PINZÓN  
Gerente General

Proyectó: Dr. Jaime Cárdenas López  
Revisión Jurídica: Dra. Norma Piedrahita Marroquín  
gloria inés b. (26 febrero 2007)

## **ANEXO VIII. Manual de buenas practicas de siembra MANEJO DEL RIESGO**

### **Lineamientos para buenas prácticas de experimentación.**

El objetivo principal de estos ensayos es demostrar que mediante la aplicación de los principios del manejo de riesgo, y el uso de protocolos científicos, las pruebas de campo con maíz genéticamente modificado (GM) se pueden desarrollar en forma segura en México.

Los protocolos fueron elaborados con la finalidad de generar información que permita a los reguladores Mexicanos tomar decisiones fundamentadas en datos científicos generados en nuestro país sobre la incorporación de maíz GM en las prácticas agrícolas tradicionales.

Para evaluar el efecto potencial de un transgén en maíces híbridos se propone medir su comportamiento agronómico en comparación con material convencional de fondo genético común en diferentes ambientes dentro de la Republica Mexicana. De esta manera se tendrá información tanto de efectos no esperados que pudiesen modificar sus características agronómicas como de la adquisición de características no deseables de adaptación que pudieran estar relacionadas con una nueva capacidad para desplazar a otras plantas.

Como toda tecnología, es necesario también medir los posibles beneficios que los maíces GM con características específicas proporcionarían a los productores Mexicanos. El beneficio potencial de esta tecnología para la productividad nacional se evaluará en campo observando el desempeño de las diferentes características conferidas mediante la biotecnología al maíz (resistencia a insectos plaga, tolerancia a herbicidas) respecto de sus contrapartes convencionales que utilicen opciones convencionales de manejo agronómico para contender con plagas y maleza y así establecer con parámetros analíticos científicamente sustentados su beneficio para la práctica agrícola nacional.

### **1.- PROPÓSITO**

La conducción segura de evaluaciones de campo experimentales con OGMs de uso agrícola sólo puede lograrse a través de la combinación de un marco regulatorio, medidas de manejo del riesgo sustentadas científicamente, personal regulatorio capacitado y comprometido con su tarea y personal de campo capacitado que respete los términos y condiciones de la autorización del ensayo.

El objetivo de este documento es:

- Permitir el cumplimiento de los términos y condiciones de autorización para la realización de los ensayos de campo mediante un manejo responsable y uniforme de los protocolos experimentales.

### **2.- ALCANCE**

Están obligados a cumplir con lo establecido en el presente anexo todas aquellas personas responsables del desarrollo de la investigación.

### **3.- RESPONSABILIDADES**

La asignación de responsabilidades específicas para el desarrollo, ejecución y seguimiento serán definidas por Pioneer de México.

#### **4. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES**

Las actividades en el desarrollo, ejecución y seguimiento estarán a cargo y serán definidas por la Pioneer de México.

#### **ENFOQUE PARA EL MANEJO DEL RIESGO EN LIBERACIONES DE CAMPO EXPERIMENTALES**

El riesgo comúnmente se expresa como el producto de dos distribuciones de probabilidad: la probabilidad de exposición a un efecto adverso y la probabilidad que ese efecto adverso pueda ocasionar un daño severo. La evaluación de riesgo comúnmente se define como un “proceso científico de obtención de mediciones cualitativas y cuantitativas de los niveles de riesgo, que incluye cálculos de los posibles efectos sobre la salud y otras consecuencias, así como el grado de incertidumbre en dichos cálculos”, libre de factores emotivos que puedan tener influencia en la percepción del riesgo. El objetivo de la evaluación de riesgo es producir información neutral y transparente sobre el riesgo, incluyendo la identificación de posibles medidas de mitigación del riesgo, para una toma de decisiones informada

Los términos y condiciones que rigen la conducción de ensayos de campo confinados incluyen provisiones específicas para el aislamiento reproductivo, el transporte seguro, la siembra, el monitoreo, la recolección de la cosecha, el almacenamiento, la disposición final y el informe final (incluyendo el desarrollo de archivos y el acceso a los registros del ensayo). Estos términos y condiciones, junto con un sistema de inspección gubernamental, ofrecen un sistema de controles que permiten que los organismos vegetales genéticamente modificados en experimentación sean evaluados en pequeña escala y con seguridad.

Las medidas de mitigación del riesgo que rigen la conducción segura de ensayos de campo confinados comprenden un enfoque triple que busca: prevenir la diseminación en el ambiente de los nuevos genes a través del polen o de las semillas; prevenir la persistencia de plantas transgénicas o de su progenie en el ambiente; y prevenir la introducción de la planta transgénica o de sus productos derivados en los procesos de las cadenas alimentarias de humanos y animales. Cuando estas medidas se implementan de una manera apropiada garantizan que el ensayo de campo confinado no constituya una amenaza para el ambiente en general, para la biodiversidad o para los animales o las personas.

Tal vez el punto de control más crítico en el manejo adecuado de los ensayos de campo experimentales es:

1. Controlar el movimiento del material vegetal desde y hacia el sitio del ensayo (transporte y limpieza de cualquier maquinaria utilizada)
2. Controlar el almacenamiento de semillas y otro material vegetal;
3. Controlar la disposición del material vegetal residual o en exceso en el sitio de ensayo – puede tratarse del exceso de material de siembra, material remanente después de la cosecha y material de las actividades de limpieza.
4. Controlar la disposición de cualquier material retenido después de la cosecha, como es el caso de las semillas que se reservan para análisis subsiguientes;
5. Controlar la cosecha indebida en el lugar del ensayo; y
6. Realizar un programa de monitoreo para verificar que no se presente dispersión del OGM.

Al igual que en programas de calidad para otras cuestiones se requiere la implementación de procesos de control y documentación efectivos con el respaldo de procedimientos de inspección y verificación.

# 1. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL EXPERIMENTAL MODIFICADO POR INGENIERÍA GENÉTICA

## 1.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentan los procedimientos operativos standard para el transporte y almacenamiento seguros de plantas y material vegetal modificado genéticamente.

## 1.2. PERSONAL

El personal debe conocer sus responsabilidades para garantizar que el material sea manipulado, empaçado, etiquetado y almacenado de manera adecuada; que se lleven registros apropiados; y que en el caso de una liberación accidental se sepa qué acciones tomar y por parte de quién. Las copias de los procedimientos operativos normalizados deben encontrarse en forma accesible para todo el personal.

## 1.3. TRANSPORTE DE MATERIAL VEGETAL EXPERIMENTAL MODIFICADO POR INGENIERÍA GENÉTICA

Independientemente de la especie o del tipo de material vegetal embarcado, los materiales vegetales genéticamente modificados deben ser empaçados en contenedores seguros y durante el transporte se deben mantener separados de otras semillas y/o material vegetal. Cualquier contenedor o formato de empaque utilizado para el transporte y almacenamiento de organismos vegetales genéticamente modificados debe poder prevenir la pérdida de semillas o de otras partes del material vegetal.

Los embarques de material vegetal genéticamente modificado deben estar claramente identificados con etiquetas. Se recomienda que la etiqueta de embarque incluya:

1. Número de Permiso para el movimiento dentro del país (cuando corresponda)
2. Número de Permiso para Importación y/o Certificado Fitosanitario (cuando corresponda)
3. Especie vegetal
4. Forma del material (por ejemplo, semilla, esqueje/vástago, tubérculo, planta entera)
5. Cualquier tratamiento de la semilla u otro tratamiento del material que pueda generar preocupaciones ante la exposición del trabajador
6. Cantidad de material despachado (por ejemplo gramos de semilla)
7. Detalles de la persona a contactar en el caso de una liberación accidental

ETIQUETA DE TRANSPORTE DE MATERIAL VEGETAL REGULADO	
Nº de Embarque	Identificador único o Nombre del evento
Nº de Permiso	Especie vegetal
Forma del material	
<input type="checkbox"/> Semilla <input type="checkbox"/> Esqueje/vástago <input type="checkbox"/> Transplante <input type="checkbox"/> Tubérculo <input type="checkbox"/> Planta completa	
Identifique cualquier tratamiento aplicado a la semilla o al material vegetal	
Persona de contacto en caso de emergencia	Teléfono

Figura 1. Ejemplo de etiqueta de embarque

Las cantidades pequeñas de semillas u otros tipos de material vegetal como tubérculos,

esquejes o plantas completas, pueden ser despachadas en un contenedor tal como una bolsa gruesa (por ejemplo 5 milésimas de pulgada de grosor) o en un sobre o paquete sellado formado por material resistente a la ruptura y la humedad (e.g. papel kraft acolchonado con burbujas de 50 lb, papel kraft recubierto de fibra gruesa del 60 lb, Tyvek<sup>TM</sup> o un equivalente). Este contenedor primario debe ser luego colocado en un contenedor secundario sellado, a prueba de goteo, que puede estar hecho con materiales como plástico termocontraíbles, aglomerado de fibra corrugada, cartón corrugado, madera u otro material de resistencia equivalente.

Para embarques más grandes de semillas, el contenedor primario debe ser una bolsa gruesa sellada dentro de un contenedor secundario sellado, a prueba de goteo, como por ejemplo un tambor metálico de 55 galones. Los embarques de lotes de semilla experimental transgénica no deben ser transportados en contenedores que posean garantías contra el derrame de la semilla, como vagones inclinados o abiertos o cajas de madera. Las bodegas de barcos, los vagones y los contenedores de camiones no deben ser considerados como contenedores primarios o secundarios.

### **1.3.1. Disposición final del material vegetal experimental modificado por ingeniería genética**

Todos los contenedores utilizados para transportar semillas genéticamente modificadas deben limpiarse antes de ser llenados y luego de retirar de ellos el material experimental. Otra alternativa es destruir los contenedores luego de ser usados esterilizándolos, quemándolos o disponiendo el material en un relleno sanitario, según los recursos existentes. Todo material vegetal residual recuperado durante el proceso de limpieza debe ser sometido a procesos que lo hagan inviable. Tanto quien despacha como quien recibe el material vegetal experimental modificado por ingeniería genética debe saber cómo disponer de manera efectiva y segura todo el material indeseable. Los responsables de las instalaciones podrán tener en cuenta métodos tales como el calor seco, el vapor, la trituración, la incineración o el tratamiento con herbicidas y/o compuestos químicos debidamente etiquetados.

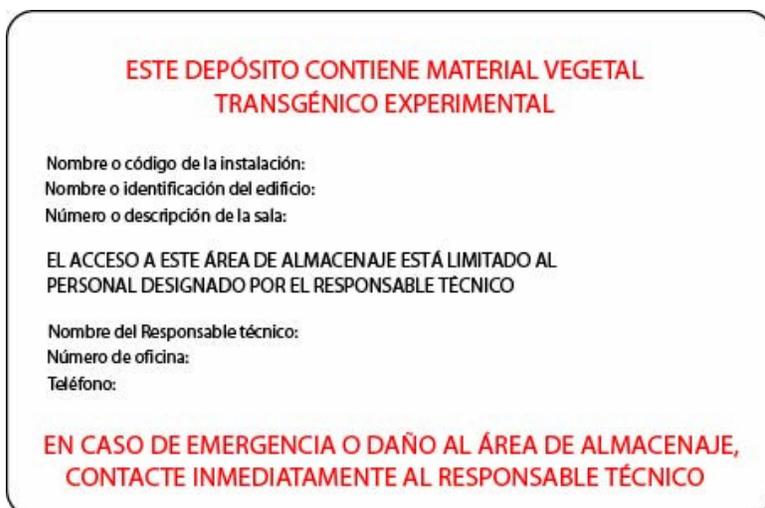
### **1.3.2. Registros e informes**

Es importante llevar registros del transporte de materiales vegetales modificados por ingeniería genética a medida que son trasladados entre instalaciones de investigación, de almacenamiento y los predios en los que se realizarán los ensayos de campo. Estos registros podrán ser examinados por los reguladores para garantizar que haya un sistema adecuado de seguimiento de los vegetales experimentales transgénicos. El despachador debe notificar al destinatario la fecha, el tipo y cantidad de material que será enviado antes de su embarque. En el momento de recibir el material, quien los reciba debe confirmar fehacientemente que el envío ha llegado intacto y que no ha habido pérdida alguna. Posteriormente, quien recibe el envío debe informarle al despachador que el material se recibió en condiciones satisfactorias.

## **1.4. ALMACENAMIENTO DE MATERIALES VEGETALES EXPERIMENTALES MODIFICADOS POR INGENIERÍA GENÉTICA**

Los tres aspectos claves para el almacenamiento adecuado del material vegetal son: separación, seguridad y etiquetado.

Generalmente, una área apropiada de almacenamiento es aquella en la que el material vegetal pueda guardarse en forma separada de otros materiales vegetales experimentales o convencionales. Cuando sea pertinente, el área debe ser un espacio completamente cerrado (por ejemplo, cabina, oficina, armario, cuarto refrigerado) con puertas de acceso que puedan ser cerradas y aseguradas. Si posee ventanas, también se deben cerrar y asegurar. Cuando se utiliza un área única de almacenamiento para guardar distintas muestras de uno o más eventos transgénicos, cada línea, variedad o evento se debe almacenar por separado en un contenedor sellado y etiquetado. Este puede ser, además, el contenedor primario usado para el embarque.



**Figura 2. Ejemplo de una etiqueta de identificación para el lugar de ingreso a un área de almacenaje**

Las áreas de almacenaje serán etiquetadas mencionando que contienen material vegetal experimental genéticamente modificado. Las etiquetas deben adherirse a los contenedores en el lugar de entrada, recomendándose que el acceso a los depósitos se restrinja sólo al personal autorizado. En la Figura 2 se presenta un modelo de etiqueta del área de almacenaje.

#### **1.4.1. Disposición final de vegetales modificados genéticamente**

Las áreas de almacenamiento se deben limpiar antes e inmediatamente después del periodo de almacenamiento. Todo el material residual recuperado durante la limpieza debe someterse a tratamientos que lo hagan inviable y desecharse por los medios apropiados. Esto también se aplica para todo material vegetal experimental que se extraiga del almacenamiento con el propósito de desecharlo.

#### **1.4.2. Registros e informes**

Es conveniente llevar un inventario de todo el material vegetal transgénico almacenado y de las submuestras que puedan ser sacadas del área de almacenamiento con fines experimentales u otros propósitos. Esto permite garantizar que la parte autorizada puede efectuar el seguimiento de los materiales experimentales almacenados y que puede identificar con certeza si algún material ha sido retirado sin permiso. Igualmente, es importante garantizar que las áreas de depósito sean mantenidas adecuadamente para que no haya liberaciones no intencionales de los materiales vegetales. El área de almacenamiento debe ser inspeccionada a intervalos regulares y se debe llevar un registro de estas inspecciones.

### **1.5. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL**

En el caso de una liberación accidental de material vegetal experimental durante el transporte o el almacenamiento, el incidente debe mantenerse bajo control y la persona a quien se otorgó el permiso (la parte autorizada) debe ser notificada de inmediato acerca de la situación. Si ya ha ocurrido una liberación accidental, la parte autorizada deberá asegurar la recuperación de la mayor cantidad posible del material experimental transgénico. El lugar de una liberación accidental debe ser marcado y manejado para asegurar que no haya liberaciones adicionales del material. Todas las acciones correctivas adoptadas para resolver una liberación accidental durante el transporte o el almacenamiento deben documentarse.

Después que la acción correctiva ha sido adoptada para resolver una cuestión de incumplimiento de la norma, la parte autorizada deberá llevar a cabo un análisis de la situación

para identificar sus causas y luego determinar los cambios que sea necesario introducir en las prácticas de manejo o sino contar con personal adicional capacitado para garantizar que la situación no se reitere.

## **2. MANEJO DEL LUGAR DEL ENSAYO.**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Los ensayos de campo experimentales con organismos vegetales genéticamente modificados ofrecen a los investigadores, tanto del sector público como privado, la oportunidad de evaluar el desempeño agronómico y la adaptación al ambiente de estos materiales. Para evitar las liberaciones accidentales, los ensayos de campo se manejan de acuerdo con un conjunto de prácticas diseñadas buscando el confinamiento durante el ciclo del cultivo y el período post cosecha. Estas prácticas suelen incluir métodos de aislamiento reproductivo y monitoreo del lugar. El manejo seguro de los ensayos debe garantizar que ningún material vegetal proveniente de los mismos sea empleado en los procesos vinculados con la cadena alimentaria humana o animal sin consultar y contar con la autorización previa de las autoridades regulatorias pertinentes (de salud).

Este capítulo presenta información sobre las prácticas que se pueden adoptar para contribuir al manejo seguro de ensayos de campo experimentales durante el período de crecimiento del cultivo.

### **2.2. PERSONAL**

La persona a quien le ha sido otorgada una autorización para la realización del ensayo (la parte autorizada) deberá garantizar que todo el personal que tenga acceso o trabaje en el lugar durante el ciclo del cultivo, el período de cosecha y el de post cosecha esté adecuadamente capacitado. Esto significa que deben conocer sus responsabilidades en cuanto al confinamiento del ensayo, al mantenimiento de registros adecuados y sobre las acciones tomar en caso de producirse daños en el lugar del ensayo o una liberación accidental, teniendo presente quién es responsable de llevarlas adelante.

### **2.3. SIEMBRA DEL ENSAYO**

#### **2.3.1. Selección del lugar del ensayo**

Al seleccionar la ubicación de los ensayos de campo de cultivos de plantas transgénicas se deben tener en cuenta múltiples consideraciones. En primer lugar, los responsables de los ensayos deben conocer los ecosistemas vecinos para hacer una evaluación de aspectos relativos a la seguridad ambiental. En segundo lugar, se debe examinar las reales posibilidades de mantener el aislamiento reproductivo; la localización y las dimensiones del lugar deben ser manejables para poder llevar a cabo un monitoreo continuo del sitio. Tercero, se deben resolver consideraciones de largo plazo tal como las implicaciones de las restricciones post cosecha en el uso de la tierra. Cuarto, se deben tener en cuenta los impactos potenciales en los campos vecinos en el caso de una liberación accidental.

#### **2.3.2. Demarcación del lugar del ensayo**

Una vez seleccionado el lugar en que se llevará a cabo el ensayo, para identificar el lote tanto durante el período de crecimiento como en el de restricción post cosecha en el uso de la tierra, se procederá a señalar sus cuatro esquinas con marcadores cuasi-permanentes (por ejemplo, postes de metal, PVC o fibra de vidrio). Una opción es registrar las distancias entre las cuatro esquinas del lugar y contar con ciertas referencias permanentes, tales como postes del teléfono o de electricidad, cercas, caminos o vías. Para el registro exacto de las cuatro esquinas del ensayo se tomarán las coordenadas del sistema de posicionamiento global (GPS).

### 2.3.3. Mapa del lugar del ensayo

Se incluirán los planos del ensayo. Los detalles a incluir en el mapa del ensayo, deben considerarse los siguientes elementos:

1. Nombre del responsable del ensayo y detalles para contactarlo.
2. Código de referencia para el o los ensayos dentro del lugar de realización del mismo.
3. Número de permiso del ensayo.
4. Caracterización legal o descriptiva del terreno.
5. Dimensiones exactas del lugar del ensayo.
6. Área total sembrada con el OGM, incluyendo bordes (m<sup>2</sup> ó ha).
7. Distancias exactas a las señales permanentes o referencias cercanas como postes del teléfono, cercas, caminos o vías y/o coordenadas de GPS.
8. Identificación de todos los lotes dentro del perímetro de aislamiento, mencionando el nombre común del cultivo.
9. Fecha de siembra.
10. Puntos cardinales, con el Norte hacia la parte superior de la página.

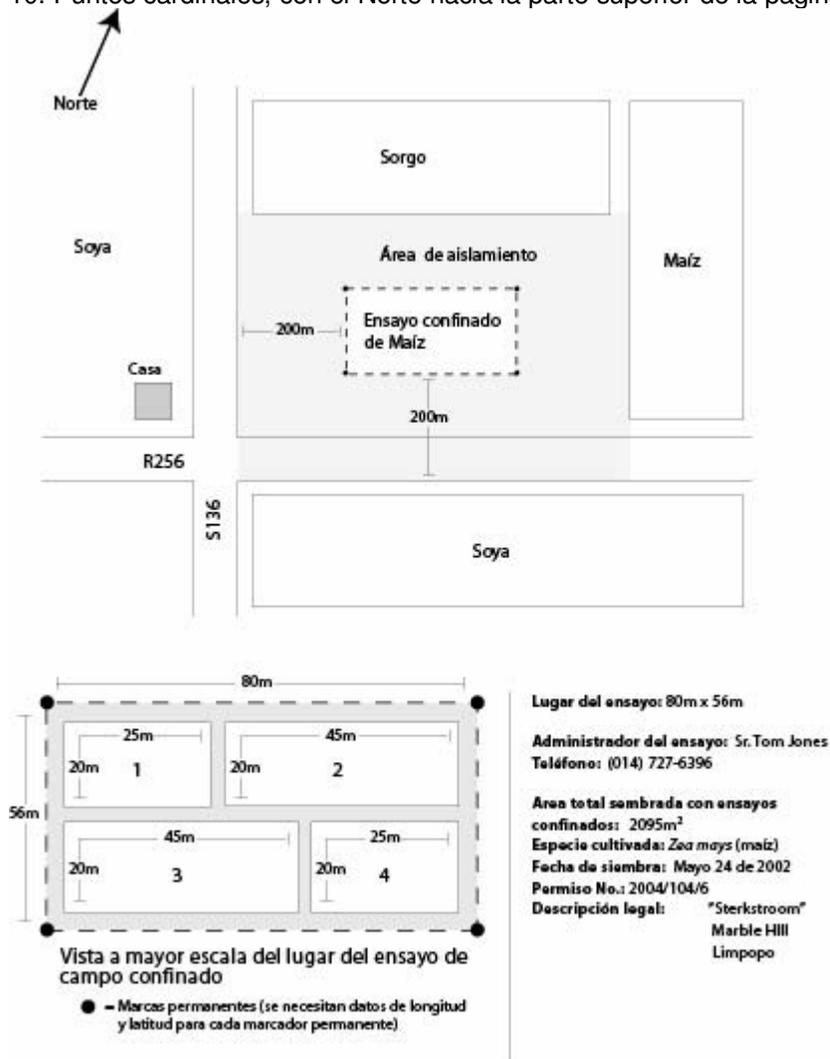


Figura 3. Ejemplo de un plano de lugar para el establecimiento de un ensayo de campo experimental.

### **2.3.4. Limpieza del equipo de campo**

Antes de entrar al lugar del ensayo, el equipo utilizado para sembrar o plantar ensayos de campo confinados debe dejarse limpio de todo material vegetal, incluyendo semillas y cualquier material que pudiera haber quedado como consecuencia de las tareas realizadas con anterioridad. Igualmente, todos los equipos utilizados para sembrar o plantar el ensayo o los utilizados en las prácticas culturales deben ser limpiados en el lugar del ensayo para eliminar el traslado accidental y la liberación no intencional de material experimental. Los métodos de limpieza pueden incluir limpieza manual, con aire comprimido o con agua a alta presión.

También es importante que el personal que trabaja dentro del lugar del ensayo se asegure antes de salir del lugar que sus ropas y calzado estén limpios de semillas, polen u otro material vegetal.

El material vegetal residual proveniente del proceso de limpieza del equipo empleado en el ensayo, debe someterse a tratamientos que lo hagan inviable; se puede emplear calor seco o de vapor, la trituración, la incineración o el tratamiento con herbicidas y/o compuestos químicos debidamente etiquetados. Aunque puede ser aceptable transportar material desde el sitio del ensayo para su destrucción fuera del mismo (por ejemplo, autoclave en un laboratorio), se recomienda que el material sea eliminado en el mismo lugar en que se realiza el ensayo para limitar la posibilidad de una liberación accidental.

## **2.4. AISLAMIENTO REPRODUCTIVO DE LOS ENSAYOS**

### **2.4.1. Biología reproductiva de la especie en experimentación**

Para establecer los medios más efectivos para lograr el aislamiento reproductivo de un ensayo de campo confinado, es necesario estar familiarizado con la biología de la especie vegetal y más específicamente con su biología reproductiva.

## **2.5. AISLAMIENTO REPRODUCTIVO DE LOS ENSAYOS. MÉTODOS**

### **2.5.1. Aislamiento espacial**

Los ensayos a campo con organismos vegetales genéticamente modificados pueden aislarse reproductivamente de otras plantas de la misma especie o de parientes sexualmente compatibles separándolos con una distancia mínima. Todas las plantas de la misma especie o de especies relacionadas presentes en la zona de aislamiento deben ser removidas antes de la antesis o de la formación de la semilla y tratarse de manera tal que resulten inviables.

### **2.5.2. Aislamiento temporal**

Bajo ciertas condiciones ambientales, el aislamiento reproductivo de los lugares en los que se realizan los ensayos puede lograrse mediante el aislamiento temporal. Ello requiere escalonar la siembra del ensayo para que la liberación del polen se haya completado totalmente antes o después de la liberación del polen correspondiente de cualquier planta de la misma especie que pueda haberse cultivado dentro de la zona de aislamiento reproductivo. El aislamiento temporal se debe utilizar cautelosamente y no se recomienda en muchos ambientes por la variabilidad inherente a las condiciones de crecimiento que no hacen posible la predicción exacta del

momento de la antesis. Para que el aislamiento temporal sea efectivo, se debe contar con un sistema de monitoreo regular para asegurarse que la antesis del material experimental no sea concurrente con la de las plantas adyacentes de la misma especie que no son objeto del ensayo. Si la antesis de las plantas del ensayo y de las que no pertenecen al mismo resulta concurrente, se habrá presentado una transgresión del aislamiento reproductivo.

Cuando se ha producido una transgresión del aislamiento temporal y ya ha ocurrido la liberación del polen del material experimental genéticamente modificado, la parte autorizada debe ser notificada de inmediato para evaluar si es posible restablecer el confinamiento mediante aislamiento espacial.

#### **2.5.4. Bordo**

Los ensayos a campo de algunas especies como el algodón o la canola pueden aislarse reproductivamente de individuos de la misma especie o de especies relacionadas que crezcan en la zona de aislamiento sembrando en su perímetro un bordo ininterrumpido de especies vegetales convencionales. El ancho del bordo es específico según la especie. Comúnmente, la variedad convencional utilizada para sembrar en el bordo debe: 1) madurar al mismo tiempo que el evento transgénico; 2) ser sembrada a una densidad comparable a la del ensayo; y 3) ser manejada utilizando prácticas agronómicas comunes. Los responsables de los ensayos a campo deben monitorear estrechamente la emergencia de las hileras de los bordos y resembrarlos rápidamente si no resultó adecuado. Para que los bordos sean efectivos, se debe contar con un sistema de monitoreo frecuente que confirme que la antesis del material experimental y de las plantas del bordo son concurrentes.

Las hileras de plantas de los bordos suponen desafíos específicos para el manejo del ensayo tales como el traslado de los equipos y la forma en que se resolverá la situación que produce cuando la floración de la variedad sembrada en el bordo es asincrónica con relación a las plantas en el ensayo. Adicionalmente, si el material experimental expresa un carácter de tolerancia a herbicidas, no compartido con la variedad del bordo, se debe tener cuidado en garantizar que las hileras del bordo susceptible al herbicida no sean afectadas cuando se aplique el herbicida a las plantas del ensayo. Si el bordo no se mantiene según lo descrito y hay transgresión del aislamiento reproductivo, la parte autorizada debe ser notificada de inmediato para evaluar si se puede restablecer el confinamiento.

### **2.6. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL**

En el caso de una liberación accidental de material vegetal experimental durante la siembra o desde el lugar del ensayo, el incidente debe mantenerse bajo control y la persona a quien se otorgó el permiso (la parte autorizada) debe ser notificada de inmediato acerca de la situación. Si ya ha ocurrido una liberación accidental, la parte autorizada deberá asegurar la recuperación de la mayor cantidad posible del material experimental transgénico. El lugar de una liberación accidental debe ser marcado y manejado para asegurar que no haya liberaciones adicionales del material. Todas las acciones correctivas adoptadas para resolver una liberación accidental durante la siembra y desde el lugar del ensayo deben documentarse.

Después que la acción correctiva ha sido adoptada para resolver una cuestión de incumplimiento de la norma, la parte autorizada deberá llevar a cabo un análisis de la situación para identificar sus causas y luego determinar los cambios que sea necesario introducir en las prácticas de manejo o contar con personal adicional capacitado para garantizar que la situación no se reitere.

### **2.7. REGISTROS E INFORMES**

Los responsables de los ensayos deben comprometerse a conservar completos, actualizados y bien organizados los documentos importantes para la siembra y manejo del ensayo, de manera

tal de garantizar una fácil recuperación de los registros. En la realización de una auditoría por parte de auditores internos o externos o de las autoridades regulatorias, la documentación puede ser solicitada y por consiguiente debe estar disponible para la revisión. El contenido y la calidad de estos materiales pueden ser empleados como elemento de juicio para evaluar si el ensayo ha alcanzado todos los requerimientos fijados por la regulación o pueden ayudar a demostrar la diligencia debida si surge algún interrogante o problema durante la ejecución del ensayo o durante una auditoría.

Se debe comenzar un programa regular de monitoreo en el momento de la siembra y continuarlo hasta la cosecha.

El monitoreo del ensayo ofrece además una oportunidad de observación y recolección de datos referentes a los materiales experimentales. Esto es de particular importancia para los investigadores que deseen presentar una solicitud de comercialización, pues el monitoreo de los impactos en organismos no blanco y plagas, y la susceptibilidad a enfermedades o el comportamiento anormal (por ejemplo, dormancia ampliada, morbilidad excesiva) es requerido para sustentar una evaluación ambiental del riesgo.

Todos los problemas, de carácter técnico o administrativo, relacionados con el cumplimiento, encontrados durante el ciclo del cultivo deben ser revisados. Al hacerlo, los responsables de los ensayos pueden mejorar su programa de gestión en forma continua, incorporando nuevas actividades sobre la base de la experiencia obtenida.

### **3. COSECHA Y DISPOSICIÓN FINAL DE MATERIALES DE ENSAYOS DE CAMPO CONFINADOS**

#### **3.1. INTRODUCCIÓN**

La cosecha de ensayos de campo experimentales con organismos vegetales genéticamente modificados requiere ser realizada en forma cuidadosa. Los ensayos deben ser cosechados de tal manera que se evite la liberación accidental de eventos transgénicos así como su persistencia en el lugar del ensayo. Tampoco se permite que el material vegetal proveniente del ensayo sea introducido en la cadena alimentaria humana o animal sin la consulta y aprobación previas por parte de las autoridades sanitarias pertinentes. Este capítulo indica las prácticas a ser adoptadas para contribuir a una cosecha segura de los ensayos de campo experimentales.

#### **3.2. RETENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL COSECHADO DE LOS ENSAYOS DE CAMPO EXPERIMENTALES**

Es bastante común que quien ha recibido un permiso de experimentación a campo (la parte autorizada) desee conservar material vegetal del lugar del ensayo. Es posible que la semilla sea necesaria para ensayos a realizar en el futuro o que los tejidos vegetales lo sean para análisis de laboratorio.

#### **3.3. LIMPIEZA DEL EQUIPO**

El equipo utilizado para cosechar ensayos a campo experimentales debe estar limpio de cualquier material vegetal antes de ingresar al lugar del ensayo, incluyendo semillas y material vegetal remanente de operaciones previas. Igualmente, todos los equipos utilizados para cosechar el ensayo deben ser limpiados en el sitio de ensayo para eliminar el transporte y la liberación accidental de material vegetal experimental. Los métodos de limpieza pueden incluir limpieza manual, con aire comprimido o con agua a alta presión.

El material vegetal residual recuperado durante el proceso de limpieza del equipo en el lugar del ensayo debe ser tratado para hacerlo inviable. Se podrán tener en cuenta métodos tales como el calor seco, vapor, trituración, incineración, entierro profundo o tratamiento con herbicidas y/o productos químicos debidamente etiquetados.

### **3.4. FINALIZACIÓN ANTICIPADA DE LOS ENSAYOS**

En algunas circunstancias se puede dar por terminado un ensayo antes de la fecha prevista para su cosecha, por ejemplo debido a condiciones ambientales desfavorables (como, granizo, sequías, huracanes) o debido a consideraciones relacionadas con el cumplimiento de las condiciones establecidas en el permiso. Los ensayos que deben darse por finalizados en forma temprana serán destruidos antes de formen su semilla y luego serán enterrados con maquinaria o tratados con herbicidas debidamente etiquetados, para proceder así a la disposición final del material vegetal. Inmediatamente luego de finalizado el ensayo se implementarán las condiciones post cosecha.

### **3.5. DISPOSICIÓN FINAL DEL MATERIAL VEGETAL DEL ENSAYO**

El material vegetal de un ensayo que no sea conservado para fines de investigación, tal como los granos, las raíces, los tallos o las hojas, deben tratarse para hacerlos inviables por un medio aceptable para la autoridad regulatoria. Se podrán tener en cuenta métodos tales incineración, entierro profundo o tratamiento con herbicidas y/o productos químicos debidamente etiquetados. Esto aplica tanto para las plantas del ensayo como para las de las hileras de los bordos utilizadas como aislamiento reproductivo. Cuando se remueva material del sitio de ensayo hacia una instalación, para su análisis, almacenamiento o disposición final inmediata (por ejemplo, incineración, autoclave), se garantizará que el material sea transportado adecuadamente.

### **3.6. TRANSPORTE DE MATERIALES COSECHADOS DESDE EL SITIO DEL ENSAYO**

Cuando el material vegetal cosechado es transportado desde el lugar en que se realizó el ensayo hacia una instalación en particular, ello debe realizarse de manera tal de prevenir cualquier liberación accidental.

### **3.7. MONITOREO DE LA COSECHA DEL ENSAYO**

El responsable del ensayo o quien él designe deberá monitorear la cosecha para asegurar que:

1. El material que va a ser conservado no se mezclará inadvertidamente con otro material vegetal durante la cosecha.
2. El material a ser removido del sitio de ensayo será etiquetado adecuadamente en forma previa al transporte,
3. Todo el material vegetal remanente se tratará de modo tal que resulte inviable y se procederá a su disposición final en el lugar en que se desarrolló el ensayo.
4. La cosechadora se dejará limpia, libre de todo material vegetal experimental antes de abandonar el lugar del ensayo.

### **3.8. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL**

Si durante la cosecha se produjera una liberación accidental de material vegetal experimental, el incidente será puesto bajo control y la persona a quien se otorgó el permiso (la parte autorizada) debe ser notificada de inmediato acerca de la situación. Si ya ha ocurrido una liberación accidental, la parte autorizada deberá asegurar la recuperación de la mayor cantidad posible del material experimental transgénico. El lugar de una liberación accidental debe ser marcado y manejado para asegurar que no haya liberaciones adicionales del material. Todas las acciones correctivas adoptadas para resolver una liberación accidental durante la cosecha y la disposición final deben documentarse. Después que la acción correctiva ha sido adoptada para resolver una cuestión relativa al incumplimiento de la norma, la parte autorizada llevará a cabo un análisis de la situación para identificar sus causas y luego determinar los cambios que sean necesarios en las prácticas de manejo o contar con personal adicional capacitado para garantizar que la situación no se repita.

### **3.9. REGISTROS E INFORMES**

El responsable del ensayo deberá registrar y conservar la información relativa a las actividades

relacionadas con la cosecha o con la finalización de un ensayo.

#### **4. MANEJO DEL LUGAR DEL ENSAYO DESPUÉS DE LA COSECHA**

##### **4.1. INTRODUCCIÓN**

Estas medidas están diseñadas para garantizar que cualquier planta voluntaria que crezca después de la cosecha será eliminada del lugar en el cual el ensayo se desarrolló. Todo ello con el propósito de prevenir el establecimiento del material transgénico en experimentación, y garantizar que no ingrese material proveniente del mismo en los procesos vinculados con la cadena alimentaria humana o animal, sin la consulta previa con las autoridades regulatorias. Este capítulo indica las prácticas a realizar para contribuir al manejo seguro de ensayos de campo experimentales luego de la cosecha.

##### **4.2. RESTRICCIONES POST COSECHA**

Los lugares en los que se realizan ensayos de campo experimentales usualmente son sujeto de restricciones de uso, según el cultivo en cuestión. El periodo post cosecha comienza inmediatamente después de la cosecha o de la finalización del ensayo por cualquier motivo que sea.

Durante el periodo post cosecha, todas las plantas prohibidas (incluye a las voluntarias de los eventos transgénicos en experimentación y a cualquier pariente sexualmente compatible) deben ser removidas del lugar en el cual se desarrolló el ensayo antes de la antesis. Es necesario emplear algún método que haga que estas plantas sean inviables y proceder luego a su disposición final; un método común es eliminar las plantas prohibidas y luego quemarlas o enterrarlas en el sitio en el cual tuvo lugar el ensayo.

##### **4.3 MONITOREO POSTCOSECHA DEL LUGAR DEL ENSAYO**

El monitoreo del lugar del ensayo (y de la distancia de aislamiento cuando se requiera) durante el período post cosecha debe comenzar tan pronto se coseche o termine el ensayo y debe continuar durante el periodo establecido, cuando las condiciones sean favorables para la germinación y crecimiento de plantas voluntarias. El responsable del ensayo, o quien él designe, deberá monitorear frecuentemente el sitio en el cual se hizo el ensayo para garantizar que las plantas prohibidas no aparezcan.

##### **4.4. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL**

Si se produjera una liberación accidental del material vegetal en experimentación en el sitio en el cual tuvo lugar el ensayo (período posterior a la cosecha), el incidente deberá ser puesto bajo control y la persona a quien le fuera otorgado un permiso (la parte autorizada) deberá ser notificada de inmediato acerca de la situación. Si ya ha ocurrido una liberación accidental, la parte autorizada deberá asegurar la recuperación de la mayor cantidad posible del material experimental transgénico. El lugar de una liberación accidental debe ser marcado y manejado para asegurar que no haya liberaciones adicionales del material. Todas las acciones correctivas adoptadas para resolver una liberación accidental durante el manejo post-cosecha deben documentarse. Después que la acción correctiva ha sido adoptada para resolver una infracción, la parte autorizada deberá llevar a cabo un análisis de la situación para identificar sus causas y luego determinar los cambios que sean necesarios en las prácticas de manejo o contar con personal adicional capacitado para garantizar que la situación no se repita.

##### **4.5. REGISTROS E INFORMES**

El responsable del ensayo deberá registrar y conservar la información relativa a las actividades relacionadas con el monitoreo post cosecha del lugar en que se llevó a cabo un ensayo.

## **ANEXO X. Currículos de las personas responsables de las evaluaciones de campo**

### **LEONEL AVILES MORALES**

**Domicilio: Av de las gladiolas 4135 Res. Molino de Flores.  
Culiacán, Sinaloa.**

Telefonos:

**Part. (52) (667) 1738083**

**Mobil (52) (667) 7512234**

**E-mail: [lavilesmorales@dow.com](mailto:lavilesmorales@dow.com)**

#### **DATOS PERSONALES**

Fecha de nacimiento: 07 de Diciembre de 1972

Lugar de Nacimiento: Costa Rica, Culiacan. Sinaloa.

Estado civil: Casado con Yolanda Moreno de Avilés  
Dos Hijos : María Fernanda y Leonel.

#### **ESTUDIOS PROFESIONALES**

1990-95.- Ingeniería Agronómica con especialidad en Parasitología en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

#### **DESARROLLO PROFESIONAL**

1995-actualidad.- Desarrollo de diversas moléculas insecticidas y fumigantes de suelo dentro del departamento de Investigación de Dow AgroSciences de México a través de todas las regiones hortícolas importantes del país y el extranjero.

#### **LOGROS OBTENIDOS:**

- Caracterización de diversos insecticidas y Fumigantes de suelo que actualmente se encuentran en el mercado como productos líderes de ventas contribuyendo esto en un incremento directo de aportaciones por ventas de dichos productos a la empresa, así como moléculas experimentales.
- Establecimiento de relaciones con las compañías

Hortícolas más importantes de El Bajío, Sinaloa; Sonora y BC, así como con los productores de melón más representativos del país ubicados en Tierra Caliente Gro, y Colima; incrementando así la presencia de DAS de manera importante.

- Brindar asistencia técnica puntual dentro del mercado de hortalizas en el rubro de agroquímicos y fumigantes de suelo, además de promover el uso adecuado de los pesticidas.

#### DESARROLLO PROFESIONAL

- Ganador en grupo del “Global Excellent Technology award 2003” por desarrollar un equipo de aplicación a través del sistema de riego por goteo con el cual el ahorro de la compañía fue de \$85MM USD solo por concepto de muestra experimental, además de un incremento significativo en la consistencia de los resultados en los experimentos desarrollados en ese proyecto.
- Sabático de 4 meses en Fowler IN en el Midwest Research Center de DAS en donde se caracterizaron fungicidas en hortalizas herbicidas en maíz así como colaboración en experimentos de biotecnología con maíces GMO’s.
- Ganador del “Product technology Innovation Award 2005” por rápido desarrollo de Lorsban 75WG para el control de Psillido del tomate.

#### FORMACIÓN PERSONAL (ENTRENAMIENTOS)

1990-95.- Soporte técnico dentro del programa de entomología de Hortalizas en el centro de Investigaciones del Valle de Culiacán dentro del INIFAP a cargo del M.C Mayra C. Avilés Gonzalez.

#### LOGROS OBTENIDOS:

- Obtención de conocimiento de los problemas fitosanitarios de las Hortalizas.

- Conocimiento de los principales métodos estadísticos para el establecimiento y análisis de diseños experimentales en estudios de efectividad biológica para insectos y patógenos del suelo.
- Participación en estudios de desarrollo fenológico y distribución de plagas en Tomate.
- Coordinador de ensayos con algodones Transgénicos en Sonora, Tamaulipas y La Laguna realizados por INIFAP en los ciclos 2005-06 y 2006-07.
- Negociaciones efectivas
- Trabajo en equipo
- Perfiles sociales
- Time management training
- 7 hábitos de la gente altamente efectiva
- Manejo de la Inteligencia emocional
- Estadística aplicada
- Product Stewardship
- Cursos del idioma Inglés
- Diversos cursos de manejo defensivo
- Ética laboral

Entre otros, así como la participación con exposiciones en diferentes cursos, talleres y simposium en el país y el extranjero.

**Gary D. Thompson, Ph.D**  
**Brief Biography 2008**

Gary Thompson is currently serving as a Global Product Development leader for the Crops Business of Dow AgroSciences a wholly owned subsidiary of Dow Chemical Company at the global headquarters in Indianapolis, Indiana. In this position he supports biology solutions for the Plant Genetics and Biotechnology division with a main focus on insect traits and seed treatments. He has been in this position for five years and provides oversight and support for projects in the U.S., Canada, Mexico, Columbia, Brazil, Argentina, several European countries, the Philippines and India. Prior to joining the biotechnology division he did discovery and global development for spinosad which has become a leading insecticide with registrations in over 50 countries. He is a leading authority on resistance management in insects and is the past chair of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) International and the U.S. committee. In addition to his 27 years of experience in Industry he worked on entomological research in Universities and has over 50 refereed publications. He received a Ph.D. in Entomology with a minor in genetics from Texas A&M University, a M.S. in Entomology from the University of Arkansas and a B.S. in Zoology from the University of Arkansas.

## **MS. Juan Carlos Martínez Nicolás**

### **Datos de contacto:**

PHI Servicios SA de CV  
Carr. Guadalajara-Morelis Km. 21 No. 8601-B  
Poblado de Nicolás R. Casillas  
Tlajomulco de Zúñiga, Jal. 45645  
Tel. 01(33) 3679-7979 Ext. 263 Fax. 01(33) 3679-7900  
E-mail: [juan.martinez@pioneer.com](mailto:juan.martinez@pioneer.com)

### **Desarrollo Profesional:**

#### Ocupación actual:

Senior Regulatory Associate. Pioneer International Hi-Bred. A cargo de procesos de regulación en México y Latinoamérica Norte

#### Empleo Anterior:

Asistente de Investigación. Centro de Transformación de Plantas. Universidad Estatal de Iowa. Estados Unidos de América.

### **Educación:**

Maestría en Ciencias con especialidad en mejoramiento genético vegetal a través de transformación genética por la Universidad Estatal de Iowa, Estados Unidos de América

Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia por la Universidad Autónoma Chapingo

### **Perfil Profesional**

Conocimientos de Agronomía e ingeniería genética, he trabajado en marcadores moleculares en frijol común durante la licenciatura. Tengo experiencia en transformación genética de bacterias, arabidopsis, soya y maíz. El título de mi tesis de maestría fue: Establishment of Transformation Systems Using Inbred-Maize Mature Seeds. Recién este año me uní al equipo de regulación de Pioneer Hi Bred Internacional en donde estoy a cargo de procesos regulatorios de OGM's en México y en varios países de América Latina Norte, así como del registro y protección varietal de los materiales vegetales generados entre otras cosas.