SOLICITUD DE PERMISO PARA LIBERACIÓN EXPERIMENTAL AL AMBIENTE DEL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO MAÍZ MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 (MAÍZ YIELDGARD VT PRO/RR-2) EN CAMPOS DE AGRICULTORES COOPERANTES BAJO LA SUPERVISIÓN DE: INSTITUCIONES DE INVESTIGACIÓN RECONOCIDAS, PUBLICAS (GUBERNAMENTALES) Y/O PRIVADAS, COMO EL INIFAP Y MONSANTO, ESPECIALIZADAS EN LA MATERIA, EN EL ESTADO DE SONORA DURANTE EL CICLO AGRÍCOLA OTOÑO-INVIERNO (OI) 2009.

I. NOMBRE, DENOMINACIÓN O RAZÓN SOCIAL DEL PROMOVENTE Y, EN SU CASO, NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL;

Monsanto Comercial S.A de C.V
Representante Legal
Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico

II. DOMICILIO PARA OÍR Y RECIBIR NOTIFICACIONES, ASÍ COMO EL NOMBRE DE LA PERSONA O PERSONAS AUTORIZADAS PARA RECIBIRLAS;

Prolongación Paseo de la Reforma 1015 Torre A Piso 21
Desarrollo Santa Fe
01376 México, D.F.

Personas autorizadas para recibir las notificaciones:
a) Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico
b) Ing. José Javier Gándara Espinosa**.**

III. DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO PARA RECIBIR NOTIFICACIONES, EN CASO DE QUE EL PROMOVENTE DESEE SER NOTIFICADO POR ESTE MEDIO;

NOMBRE	CARGO	Correo electrónico
Dr. Jesús Eduardo Pérez Pico	Director de Desarrollo de Tecnologías y Regulatorio de Latinoamérica Norte	eduardo.perez.pico@monsanto.com
Ing. José Javier Gándara Espinosa**.**	Gerente de Asuntos Regulatorios	jose.javier.gandara@monsanto.com

IV. MODALIDAD DE LA LIBERACIÓN SOLICITADA Y LAS RAZONES QUE DAN MOTIVO A LA PETICIÓN;

Con base en los Artículos 32 fracción I, 42 y 43 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (DOF 18-03-2005), y al Titulo Segundo, Capítulo I, Artículos 5, 6 y 7, y al Capítulo II, Artículo 16, del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

Solicitamos la liberación experimental al ambiente del maíz genéticamente modificado MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 (Maíz YieldGard VT PRO/RR-2), **en campos de agricultores cooperantes bajo la supervisión de: instituciones de investigación reconocidas, publicas (gubernamentales) y/o privadas, como el INIFAP y MONSANTO, especializadas en la materia, en el estado de Sonora**, durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno (O-I) 2009.

La presente solicitud se realiza con el propósito de analizar la efectividad del evento MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 en el control integrado de insectos plaga y maleza asociados al cultivo de maíz en México, mediante el establecimiento en campo de parcelas experimentales.

Los objetivos Agronómicos de la liberación experimental solicitada son:

A. Evaluar la respuesta de híbridos de maíz con germoplasma adaptado a las condiciones de campo en México que incorporan las características de resistencia frente a plagas de insectos lepidópteros (MON-89Ø34-3) y la de tolerancia a glifosato (MON-ØØ6Ø3-6), frente a la infestación de plagas y maleza de importancia económica en nuestro país:

- Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith.),
- Gusano barrenador del suroeste (*Diatraea grandiosella* Dyar.),
- Gusano barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis* F.),
- Gusano elotero (*Heliothis zea*)
- Maleza propia de los campos de cultivo donde se realizarán los ensayos.

B. Comparar los métodos tradicionales para el control de las plagas y maleza con un programa de manejo integrado que utilice maíces híbridos que incorporen la tecnología MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6.
C. Evaluar el costo beneficio de la tecnología MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 en el manejo integrado de las plagas y maleza bajo las condiciones normales de producción de maíz en el Estado de Sonora.

Los objetivos Medio Ambientales de la liberación experimental solicitada son:

D. Obtener información relevante sobre los posibles riesgos que la liberación del maíz con tecnología MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 pudiera generar al medio ambiente y a la diversidad biológica mediante:
    a. Generación de datos que permitan estimar la equivalencia agronómica del maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 en comparación con su control convencional y sus interacciones ecológicas.
    b. Monitoreo de insectos no blanco en el cultivo de maíz.
    c. Información biogeográfica de la distribución de parientes silvestres y razas del cultivo en la región.
    d. Información biogeográfica de la maleza asociada al cultivo de maíz.
    e. Establecer las bases para un programa de Manejo Integral de plagas.
    f. Establecer las bases para un programa de Monitoreo de resistencia a maleza.
    g. En base a los análisis de riesgo, establecer las medidas de bioseguridad pertinentes.

Para cumplir con los objetivos, la cantidad de semilla que se necesitará tanto de MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6, como de MON-ØØ6Ø3-6 el cual funciona como un control experimental, se detalla en los protocolos anexos a esta solicitud.

TECNOLOGÍA	PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2	TOTAL (Kg)
MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6	48 kg	28.48 kg	**76.5**
MON-ØØ6Ø3-6 (Como control experimental)		*28.48 kg	**28.48**

El cálculo está establecido en base a ocho predios experimentales.
* Ya que esta solicitud es para la tecnología MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6. La cantidad de MON-ØØ6Ø3-6 (como control experimental), se adicionará a la solicitud de este evento para la liberación en fase experimental en el Estado de Sonora.

V. SEÑALAR EL ÓRGANO DE LA SECRETARÍA COMPETENTE, AL QUE SE DIRIGE LA SOLICITUD;

Conforme al capítulo I, artículo 3, fracción III de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y del Capítulo único artículo 2, fracción VII. Se dirige esta solicitud a la secretaría(as) competente(s): SAGARPA y SEMARNAT en el ámbito de sus competencias.

VI. LUGAR Y FECHA, Y

México D.F a 20 de marzo de 2009.

VII. FIRMA DEL INTERESADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL, O EN SU CASO, HUELLA DIGITAL. EL PROMOVENTE DEBERÁ ADJUNTAR A SU SOLICITUD LOS DOCUMENTOS QUE ACREDITEN SU PERSONALIDAD.

Ver anexo 1, de Representantes Legales el cual contiene los poderes.

ARTÍCULO 16. LA INFORMACIÓN QUE DEBERÁ ADJUNTARSE A LA SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN EXPERIMENTAL DE OGMS DE CONFORMIDAD CON LOS ARTÍCULOS 5, 6 Y 7 DEL PRESENTE REGLAMENTO, SERÁ LA SIGUIENTE:

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

I.A IDENTIFICADOR ÚNICO DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN

I.CARACTERIZACIÓN DEL OGM;
A) IDENTIFICADOR ÚNICO DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN, DE ORGANISMOS INTERNACIONALES DE LOS QUE MÉXICO SEA PARTE, CUANDO EXISTA;

El identificador único de este producto es MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6, mismo que se encuentra disponible en el sitio de internet del Biosafety Clearing House (http://bch.biodiv.org/) y en el sitio de internet del Biotrack Database de la OECD (http://www.oecd.org/).

B) ESPECIES RELACIONADAS CON EL OGM Y DISTRIBUCIÓN DE ÉSTAS EN MÉXICO;

I.B ESPECIES RELACIONADAS CON EL OGM Y DISTRIBUCIÓN DE ESTAS EN MÉXICO

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

Nombre científico y clasificación taxonómica del maíz

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

Se han presentado algunas variaciones en las designaciones latinas binomiales de las especies incluidas en *Zea* en años recientes (Doebley and Iltis, 1980). El género *Zea* incluye a dos subgéneros: *Luxuriantes* y *Zea*. El maíz (*Zea mays* L.) es una especie separada dentro del subgénero *Zea* junto con sus tres subespecies. Todas las especies dentro del género *Zea*, excepto el maíz, son especies diferentes de teocintles. Hasta recientemente, las especies de teocintles fueron incluidas en el género *Euchlaena* en lugar del género *Zea.*

El otro género incluido en la tribu Maydeae es *Tripsacum*. *Tripsacum* incluye 16 especies con el número básico de 18 cromosomas (n= 18), y las diferentes especies de *Tripsacum* incluyen múltiplos de 18 cromosomas, que van de 2n = 36 hasta 2n = 108.

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

Parientes del Maíz

Teocintles

Los parientes silvestres más cercanos del maíz son los teocintles y pertenecen al género *Zea*. Los teocintles son nativos de México y América Central y presentan distribución muy limitada (Mangelsdorf et al. 1981). Las especies de teocintles muestran muy poca tendencia a extenderse más allá de su distribución natural y se restringen a México y Centroamérica. No se ha reportado su presencia en el Sureste asiático (Watson & Dallwitz 1992).

- *Zea diplpperennis*
- *Zea perennis*
- *Zea mays mexicana*
- *Zea mays parviglumis*

Tripsacum

Los parientes silvestres más cercanos al maíz fuera del género *Zea* son los integrantes del género *Tripsacum*. El género *Tripsacum* se constituye por 12 especies, principalmente nativas de México y Guatemala pero ampliamente distribuidas en las regiones cálidas de los Estados

Unidos y América del Sur, con algunas especies presentes en Asia y el sureste asiático (Watson & Dallwitz 1992). Todas las especies son perennes y pastos de estación cálida.

Teocintles

Zea diploperennis
- Descripción original de la especie *Zea diploperennis*. Science, Volume 203 M.C. Molina (1985). Cytogenetic study of a tetraploid hybrid Zea diploperennis x Zea perennis. Cytologia, Volumen 50.

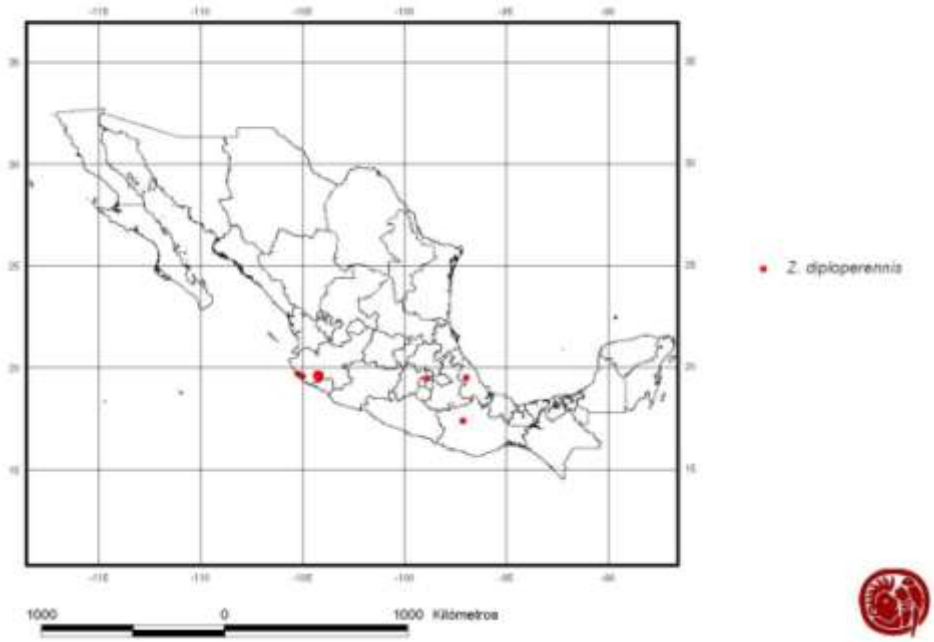
Zea perennis
- Descripción original de la especie *Zea perennis*. American Journal of Botany, Volume 29, Number 10.
- M. del C. Molina, M.D. García (1999). Influence of ploidy levels on phenotypic and cytogenetic traits in maize and *Zea perennis* hybrids. Cytologia, Volumen 64.
- M. Molina (1986). Estudio citogenético de *Zea perennis*. Genética Ibérica, Volumen 38.
- M.C. Molina (1985). Cytogenetic study of a tetraploid hybrid *Zea diploperennis* x *Zea perennis*. Cytologia, Volumen 50.
-Y.T. Kato (1984). Mecanismos de diploidización en *Zea perennis* (Hitchcock) Reeves and Mangelsdorf. Agro-Ciencia, Volumen 58.

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

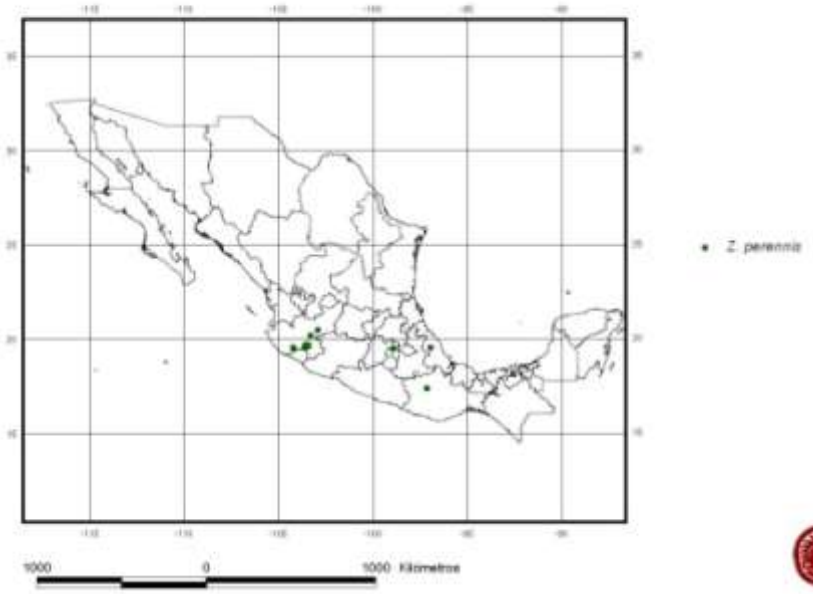
Zea mays parviglumis
- (1980). Descripción original de la subespecie Zea mays subsp. parviglumis. American Journal of Botany, Volumen 67.

Distribución

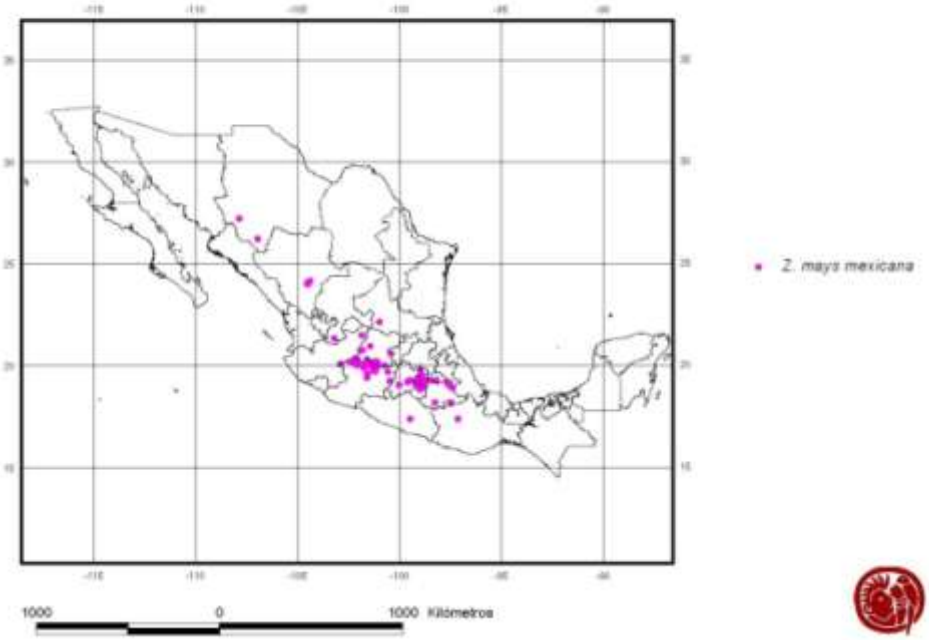
Distribución puntual de *Zea diploperennis* H.H. Iltis, Doebley & R. Guzmán en México



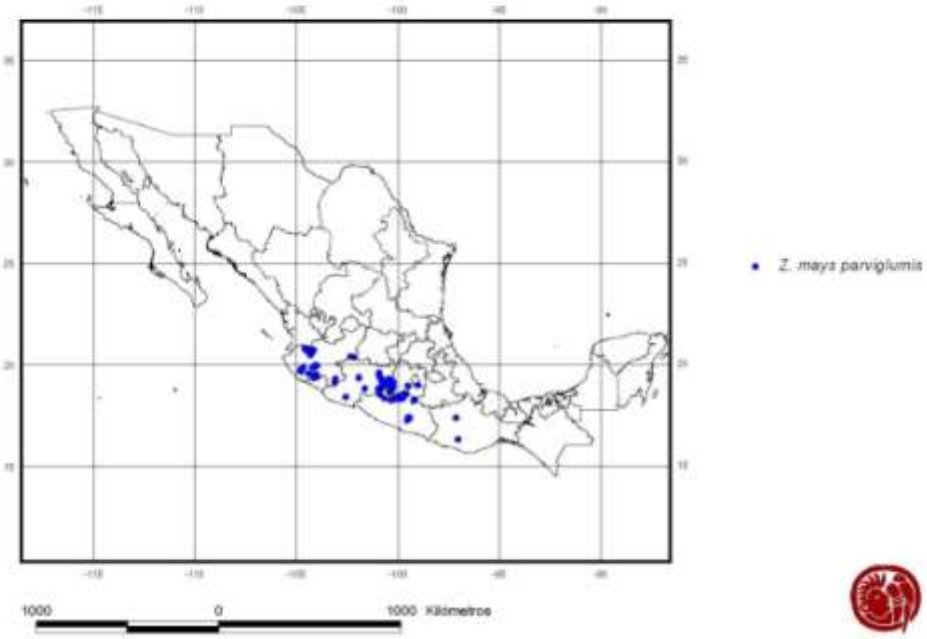
Distribución puntual de *Zea perennis* (Hitchc.) Reeves & Mangelsd. en México



Distribución puntual de *Zea mays* subsp. *mexicana* (Schrad.) H.H. Iltis en México



Distribución puntual de *Zea mays* subsp. *parviglumis* H.H. Iltis & Doebley en México



Fuente de los Mapas de Distribución Puntual: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. Maíz *Zea sp.*

Para verificar la distribución de las especies relacionadas de maíz en México, se realizó una búsqueda sobre la presencia de especies del género *Zea* en el Estado de **Sonora** en el sistema de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB)[1]. De esta búsqueda se encontró **un** reporte que se cita a continuación.

- COLECCION: Herbario de la Universidad de Sonora, México (USON) -

USON 06141 POACEAE *Zea mays* MEXICO, Sonora

Municipio - Localidad: Yécora – Yécora, Son.

Sitio: Longitud -108° 55' 6" latitud 28° 25' 5"
23.3083°; -99.0086°

Fecha de colecta: 3-Oct-1991 Colector(es): A.Reina

Hábitat: ND

Tipo de preparación: ND

Bases de datos consultadas:

- Herbario XAL del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-XAL)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-xal.html
- Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/encb-ipn.html
- Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/bangev-uach.html
- Herbario de la Universidad de Texas - Austin, EUA (LL, TEX)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ll-tex.html
- Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-BAJíO)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-bajio.html
- Colección de Monocotiledóneas Mexicanas (UAM-I)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/uam-i.html
- Herbario del Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBIO)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/inbio.html
- Árboles y Arbustos Nativos para la Restauración Ecológica y Reforestación de México (IE-DF,UNAM)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ie-df-unam.html
- Herbario Sessé y Mociño: Plantas de la Real Expedición Botánica a Nueva España (1787 - 1803) (MA)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/sesse.html
- w3TROPICOS, Jardín Botánico de Missouri (MO)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/missouri.html
- Herbario del CIBNOR
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_cibnor.html
- Herbario Weberbauer de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/lamolina.html
- Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México (FES-I, UNAM)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_valle_tehuacan_cuicatlan.html
- Herbario de la Universidad de Arizona, EUA (ARIZ)

[1] La Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) es un sistema computarizado de información biológica (incluye bases de datos de tipo curatorial, taxonómico, ecológico, cartográfico, bibliográfico, etnobiológico, de uso y catálogos sobre recursos naturales y otros temas), basado en una organización académica interinstitucional descentralizada e internacional formada por centros de investigación y de enseñanza superior, públicos y privados, que posean tanto colecciones biológicas científicas como bancos de información. La REMIB, es una red interinstitucional que comparte información biológica. Está constituida por nodos, formados por los centros de investigación que albergan las colecciones científicas.

http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/herbario_universidad_arizona.html

- Herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, México (CICY)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/cicy_yucatan.html
- Agentes Bioactivos de Plantas Desérticas de Latinoamérica (ICBG)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ibunam_ibcg.html
- Herbario Kew del Real Jardín Botánico (RBGKEW)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/kew.html
- Ejemplares tipo de plantas vasculares del Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/ejemplares_tipo_plantas_vasculares.html
- Estudio Florístico de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_floristico_ipn.html
- Estudio monográfico del género Echinopepon Naud. (Cucurbitaceae) en México (ENCB, IPN)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/estudio_monografico_ipn.html
- La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de Las Salinas, Puebla, México (FES-I, UNAM)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_utildos_comunidades.html
- Herbario de Geo. B. Hinton, México
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/hinton.html
- Colección de ejemplares tipo del Herbario de la Universidad de Texas – Austin, EUA (LL, TEX)
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/coleccion_ejemplares_herbario%20_tx.html
- Programa de repatriación de datos de ejemplares mexicanos
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/jbny.html
- Colecciones de George Boole Hinton depositadas en el herbario de Kew: Familia Leguminosae
  http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/rbgk.html

I.C EXISTENCIA DE ESPECIES SEXUALMENTE COMPATIBLES.

C) ESPECIFICACIÓN DE LA EXISTENCIA DE ESPECIES SEXUALMENTE COMPATIBLES;

Las localidades propuestas para la liberación experimental no tienen presencia de parientes silvestres, las condiciones para ubicar los predios experimentales que se tomaron en cuenta fueron las siguientes:

- Que el predio tenga aptitud para la siembra de Maíz pero el agricultor propietario siembre otro cultivo.
- En la zona no se cultiven razas o materiales criollos.
- Que alrededor del predio no se siembre maíz.
- Que la práctica agrícola regional se basa en la utilización de materiales de maíz híbridos.

En relación a los géneros de *Maydeae* en América se encuentra tres: *Zea, Euchlaena y Tripsacum*. Estos grupos han sido estudiados exhaustivamente para clarificar el origen del maíz. Como muchos pastos, los *Tripsaceae* son polinizados por el viento. Una característica distintiva de los miembros americanos es que son *monóicos*, es decir, las flores masculinas y femeninas nacen de forma separada en la misma planta. En el teocintle (*Zea* ssp.) y en el gamagrass Tripsacum, el grano nace dentro de una cariópsida compuesta por dos *glumas endurecidas.* Generalmente, hay de cinco a nueve semillas por fructificación que libera las semillas al madurar por un sistema de dispersión natural. Una diferencia distintiva entre *Zea* y

Tripsacum es que en *Zea* las flores masculinas (estaminadas) son producidas en la misma inflorescencia (la espiga) que aparece en la punta del tallos y las flores femeninas (pistiladas) usualmente se desarrollan de forma separada terminando en las ramas laterales (Eubanks, 2001). Por otro lado, en *Tripsacum* las flores masculinas usualmente sólo nacen directamente sobre las flores femeninas en la misma estructura.

El *Tripsacum* no se cruza en la naturaleza ni con el maíz cultivado, ni con el teocintle (Eubanks, 2001). Adicionalmente, si se llegan a formar híbridos artificiales, un gran porcentaje de las semillas serán estériles. Esto se debe principalmente a la diferencia en el número de cromosomas entre el maíz y el *Tripsacum*. La mayoría de las especies de *Tripsacum* tienen entre n=18, 36, 72 o 180 cromosomas comparados con n=10 del maíz (Eubanks, 2001).

Polinización y polinizadores del cultivo en su caso.

Polinización anemófila:

El movimiento de polen es el único medio efectivo para el intercambio de genes en las plantas de maíz. El polen es liberado de las espigas desde la punta de la planta y es transportado por el viento hacia las flores femeninas ubicadas en el tallo. La liberación de polen puede presentarse por un período de dos semanas con un pico máximo durante los primeros cinco días (Sears 2000). Los estigmas son receptivos durante gran parte de estas dos semanas (Kiesselbach, 1980). La velocidad y dirección del viento afectan la distribución del polen.

Polinización mediada por insectos:

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

Dispersión y dispersores en su caso.

La dispersión solo se da mediante semillas. La dispersión de semillas puede ser controlada fácilmente en maíz debido a que en el proceso de domesticación ha perdido los mecanismos de dispersión de semilla que el ancestro pudo haber tenido (Purseglove 1972). Los granos se mantienen firmemente unidos al olote y si una mazorca cae al suelo, la competencia entre las plántulas limita su crecimiento para poder llegar a la madurez (Gould 1968).

I.D HÁBITATS DE PERSISTENCIA O PROLIFERACIÓN

D) DESCRIPCIÓN DE LOS HÁBITATS DONDE EL OGM PUEDE PERSISTIR O PROLIFERAR EN EL AMBIENTE DE LIBERACIÓN;

El maíz (*Zea mays* L. ssp. *mays*) se cultiva en todo el mundo, a latitudes que van desde la línea del Ecuador hasta un poco más allá de los 50 grados norte y sur, desde el nivel del mar hasta una altura mayor a 3.000 metros, en climas frescos y cálidos, y con ciclos de crecimiento que

duran entre 3 a 13 meses (CIMMYT 2000). Es el tercer cultivo más importante en el mundo luego del arroz y el trigo, con una producción anual de 600 millones de toneladas (FAO 2000).

El maíz presenta un amplio rango de distribución en nuestro país, pudiéndose identificar materiales adaptados a las diferentes regiones agroecológicas. Los híbridos modernos de maíz han sido desarrollados para expresar un potencial de rendimiento superior en sistemas de producción agrícola que incluyen la utilización de irrigación, fertilización y protección frente al ataque de plagas y enfermedades. La caracterización del maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6, respecto de su equivalente convencional indica que el transgén conferido no ocasiona modificación de sus características (es agronómicamente equivalente) ni ha recibido nuevas características que puedan convertirlo en plaga (maleza). Por lo anterior no se espera que presente características para su dispersión al ambiente fuera de la zona de cultivo e independiente de la ayuda del ser humano.

I.E DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DEL ORGANISMO RECEPTOR Y DONADOR

E) DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DEL ORGANISMO RECEPTOR Y DONADOR DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA;

Maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6:

El maíz genéticamente mejorado MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 combina la característica de resistencia a insectos lepidópteros con la tolerancia a aplicaciones totales de herbicidas agrícolas de la Familia Faena en el mismo híbrido. El maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 se obtuvo mediante técnicas de cruzamiento convencional, tomando como parentales los materiales de maíz que contienen por separado cada uno de los eventos.

1. El maíz evento MON-89Ø34-3 incorpora de manera estable en su genoma la información genética que permite la expresión de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1A.105 y Cry2Ab2, activas contra insectos lepidópteros. La combinación de las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 en una sola planta proporciona un excelente control frente a plagas de insectos lepidópteros y ofrece una herramienta efectiva para el manejo de la resistencia en insectos.

2. El maíz MON-ØØ6Ø3-6 integra el gen cp4 epsps de Agrobacterium sp. cepa CP4. La enzima CP4 EPSPS que expresa el maíz MON-ØØ6Ø3-6 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 de herbicidas agrícolas de la Familia Faena.

ORGANISMO RECEPTOR

Clasificación Taxonómica del maíz y especies relacionadas

Familia - Gramineae
Subfamilia - Panicoideae
Tribu - Maydeae
Hemisferio Occidental:

I. Género - *Zea*

A. Subgénero - *Luxuriantes*

1. *Zea luxurians* (2n = 20)
2. *Zea perennis* (2n = 40)
3. *Zea diploperennis* (2n = 20)

B. Subgénero - *Zea*

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

Sub especies

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

II. Género - *Tripsacum*

Especies—

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

Asia:

I. Géneros—

Chionachne (2n = 20)
Coix (2n = 10, 20)
Polytoca (2n = 20)
Schlerachne (2n = 20)
Trilobachne (2n = 20)

Tribu—Andropogoneae

I. Género – *Manisuris*

ORGANISMO DONADOR EN MON-ØØ6Ø3-6 (NK 603)

***Agrobacterium sp.* cepa CP4**

El **organismo donador** del gen que codifica la enzima CP4 EPSPS tolerante al herbicida Faena Ultra® es la bacteria *Agrobacterium sp*. cepa CP4. Este gen tiene el potencial de proveer un alto nivel de protección frente a la inhibición que el herbicida ocasiona cuando es aplicado a las plantas (Padgette *et. al*., 1993).

La bacteria *Agrobacterium sp*. cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizósfera de las plantas; las Agrobacterias son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gramnegativas, flageladas, peritricas; forma colonias mucoides y blancas. La composición de bases de DNA varía de 58 a 63.5% GC. Cuando *Agrobacterium* es aislada de las raíces de las plantas en ambientes naturales o bajo cultivo, la mayoría de las cepas (más del 90%) no son patogénicas, aún cuando muchos aislamientos son hechos de plantas enfermas. Por lo tanto, *Agrobacterium* es esencialmente un habitante de la rizósfera y únicamente una proporción muy pequeña de aislamientos son fitopatógenos (contienen el plásmido Ti), las cuales causan la enfermedad conocida como agalla de la corona en un amplio número de plantas dicotiledóneas especialmente rosáceas como manzana, pera, durazno, cereza, almendra, frambuesa y rosal. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de un

tumor al nivel del suelo y aunque reduce el valor comercial de la cosecha, generalmente no causa problemas serios en plantas maduras bien establecidas.

Únicamente el gen *CP4 EPSPS* de esta bacteria fue transferido para producir el evento NK603 de maíz tolerantes al herbicida Faena Fuerte con Transorb. La secuencia del ADN transferido y de la proteína producida es completamente conocida y se encuentra presente en todas las plantas y en la mayoría de los microorganismos que comúnmente son parte de nuestra dieta, y no existe evidencia de que esta proteína pueda causar algún efecto negativo en la salud humana o de cualquier otro vertebrado.

Proteobacteria;
Clase: Alphaproteobacteria;
Orden: Rhizobiales;
Familia: Rhizobiaceae;
Género: *Agrobacterium*;
Especie: *Agrobacterium*

***ORGANISMO DONADOR EN* MON-89Ø34-3**

Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki

Bacillus thuringiensis subesp. *kurstaki*, comúnmente conocida como Bt, es una bacteria gram-positiva y anaerobia facultativa que forma inclusiones proteicas características junto a la endospora, que son tóxicas para las larvas de insectos pertenecientes al orden *Lepidóptera*. Dichas inclusiones parasporales están formadas por distintas proteínas cristalinas insecticidas (PCI). Los cristales tienen formas diversas (bipiramidales, cuboides, romboides planos, esféricos o compuestos por dos tipos de cristales), dependiendo de su composición. Se ha comprobado que existe una correlación parcial entre la morfología y la composición del cristal y la actividad biológica en los insectos blanco. Los genes que codifican las PCI se encuentran fundamentalmente en los plásmidos. Cada PCI es el producto de un solo gen. En las PCI, la susceptibilidad del huésped (reconocimiento de receptores) y la toxicidad (formación de poros) son responsabilidad de dominios distintos de la molécula (WHO, 1999).

Firmicutes;
Clase: Bacilli;
Orden: Bacillales;
Familia: Bacillaceae;
Género: Bacillus;
Especie: *Bacillus thuringiensis*

I.F PAÍS O LOCALIDAD DONDE EL OGM FUE COLECTADO, DESARROLLADO O PRODUCIDO.

F) PAÍS Y LOCALIDAD DONDE EL OGM FUE COLECTADO, DESARROLLADO O PRODUCIDO;

St. Louis, Missouri, E.U.A.

I.G REFERENCIA DOCUMENTAL SOBRE ORIGEN Y DIVERSIFICACIÓN DEL ORGANISMO RECEPTOR.

G) REFERENCIA DOCUMENTAL SOBRE ORIGEN Y DIVERSIFICACIÓN DEL ORGANISMO RECEPTOR;

Centro de Origen y Progenitores del maíz

En la actualidad existe consenso en la comunidad científica respecto a que la agricultura se originó en forma independiente en seis a ocho regiones del mundo. México es una región en donde la domesticación de plantas inició hace aproximadamente 10,000 años. Muchos científicos están de acuerdo en que el maíz se originó en México; los registros arqueológicos de mayor antigüedad se han encontrado en México (Piperno y Flannery, 2001; Benz, 2001; Smith, 2001; Pope *et al*., 2001). Evolutivamente el maíz es considerado como el descendiente domesticado de una especie tropical de teocintle; datos de isoenzimas, microsatélites y secuencias de ADN apoyan la idea de que *Zea mays* ssp. *parviglumis* es el progenitor del maíz. Los parientes silvestres del maíz conocidos colectivamente como teocintle están representados por especies anuales y por especies perennes diploides y tetraploides. La distribución del teocintle se encuentra restringida a áreas tropicales y subtropicales de México, Guatemala, Honduras y Nicaragua mayormente como poblaciones aisladas de tamaños variables ocupando superficies de una hectárea hasta varios km^2. Wilkes (1967), describió cuatro razas de teocintle para México (Nobogame, Mesa Central, Chalco y Balsas) y dos para Guatemala (Guatemala y Huehuetenango); recientemente se describió una nueva especie de teocintle para Nicaragua (Iltis y Benz, 2000).

I.H SECUENCIA GÉNICA DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN (TAMAÑO DEL FRAGMENTO, SITIO DE INSERCIÓN Y OLIGONUCLEÓTIDOS).

H) SECUENCIA GÉNICA DETALLADA DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN, INCLUYENDO TAMAÑO DEL FRAGMENTO INSERTADO, SITIO DE INSERCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA, INCLUYENDO LAS SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS QUE PERMITAN LA AMPLIFICACIÓN DEL SITIO DE INSERCIÓN;

EVENTOS APILADOS.

En la actualidad los cultivos biotecnológicos disponibles comercialmente contienen uno o pocos genes introducidos (denominados transgenes) y expresan solamente una o dos características, se espera que el número de productos obtenidos empleando la biotecnología vegetal se incremente en el mediano plazo.

Conforme avance nuestro entendimiento sobre la constitución y funcionamiento de los genes, así como del metabolismo y fisiología vegetal, el número y tipo de características introducidas en los productos de la biotecnología vegetal también se incrementará. Estos productos con "combinación de genes" (en el idioma inglés se les denomina *stacked)* –plantas mejoradas

mediante el uso de la biotecnología en las que se ubican múltiples genes que codifican para diferentes características- permitirán la incorporación de características de valor a las nuevas variedades de cultivos. Como resultado, estos productos serán cada vez más comunes. La homologación de los mecanismos internacionales para determinar inocuidad como alimento, pienso o hacia el ambiente de estos productos con "combinación de genes" será cada vez más crítica.

Los productos de la biotecnología agrícola que incorporan "combinación de genes" se pueden obtener por tres vías diferentes: (i) cruzamiento de dos plantas que previamente han recibido uno o varios genes por ingeniería genética y selección en la progenie de las plantas que los incorporen; (ii) la incorporación de un transgén adicional por transformación de una planta que previamente había sido mejorada por ingeniería genética; (iii) la inserción de múltiples genes en una planta convencional mediante un solo evento de transformación.

Productos de los tres tipos que incorporaba “combinación de genes” han sido registrados y comercializados e incluyen al maíz tolerante al herbicida y resistente a insectos (i), algodones con un espectro más amplio para el control de insectos plaga (ii) y papas protegidas contra insectos y resistentes a enfermedades virales (iii).

Caracterización MON-89Ø34-3 (MON89034) X MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

Se llevó a cabo un análisis de Southern blot para confirmar la presencia de ambos insertos de ADN provenientes de MON 89034 y NK603 en el producto apilado MON 89034 × NK603. El producto combinado produce las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 las cuales le confieren protección contra insectos lepidópteros así como la proteína 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa de *Agrobacterium sp*. cepa CP4 (CP4 EPSPS), la cual le confiere la tolerancia al glifosato, el ingrediente activo de los productos Faena®.

Las bandas de hibridación específicas obtenidas por Southern blot del MON 89034 y del NK603 fueron determinadas previamente y estas bandas específicas de los eventos individuales fueron analizadas para el evento apilado. Como era de esperarse en el evento apilado se presentaron las bandas específicas de cada uno de los eventos. Basados en los resultados de este estudio, se confirmó que el producto apilado MON 89034 × NK603 contiene los insertos de ADN intactos provenientes del MON 89034 y del NK603.

Ver carpeta de caracterización molecular

Caracterización

- MON-89Ø34-3 (MON89034)

En este estudio se realizó la caracterización del DNA integrado en el MON 89034 mediante análisis de hibridación Southern. Se analizó el número de insertos (número de sitios de integración dentro del genoma del maíz), el número de copias (el número de copias del T-DNA I dentro de un locus), la integridad de los casetes de expresión insertados *cry1A.105* y *cry2Ab2*, y la presencia o ausencia de restos del esqueleto del vector de transformación y secuencias del marcador de selección.

Los datos indican que el MON 89034 contiene una copia del inserto en un solo sitio de integración y que todos los elementos de expresión están presentes. Estos datos también demuestran que el MON 89034 no contiene secuencias detectables del esqueleto o marcador de selección del plásmido PV-ZMIR245.

El análisis de hibridación Southern demostró que la huella que identifica al evento MON 89034 se mantiene a lo largo de siete generaciones de mejoramiento, confirmando de esta manera la estabilidad del inserto en múltiples generaciones. Estas generaciones no contienen ningún elemento detectable del T-DNA II ni contienen ninguna secuencia detectable del esqueleto del plásmido PV-ZMIR245.

Finalmente se determinó la secuencia completa del inserto y la secuencia genómica adyacente en el MON 89034, lo cual confirmó la organización reportada de los elementos dentro del inserto e identificó las uniones 5' y 3' entre inserto y genoma

Caracterización

- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

El evento NK603 de maíz Roundup Ready (CP4 EPSPS) se obtuvo por transformación mediante biobalística empleando un fragmento lineal del plásmido PV-ZMGT32 que integra dos construcciones EPSPS.

El evento NK603 contiene un inserto del DNA transferido que se localiza en un fragmento *StuI* de 23 Kpb. Este inserto contiene una copia completa del fragmento empleado en la transformación y 217 pb de la región potenciadora del promotor actina de arroz. El fragmento extra de 217 pb se localiza en orientación invertida hacia el extremo 3´del casete de transformación y no contiene elementos definidos como requeridos para promover la expresión génica por lo que es altamente improbable que presente actividad promotora.

El análisis de los componentes individuales en cada una de las dos construcciones CP4 EPSPS en el DNA integrado muestra que estas se encuentran completas. La secuenciación del fragmento transferido al evento NK603 indica que el segundo casete presenta una diferencia de dos nucleótidos en el gen *cp4 epsps* (bajo el promotor e35S) respecto de la misma secuencia en el casete 1; uno de los nucleótidos origina la substitución de un residuo de prolina por leucina en la posición 214 (L214P) de la EPSPS producida a partir del casete 2.

El genoma de NK603 no contiene secuencias del esqueleto de la construcción de donde se obtuvo el fragmento empleado en la transformación, que incluye las regiones *ori* y *nptII*.

Las secuencias de los extremos 5´y 3´ del inserto se confirmaron mediante amplificación PCR.

Estos datos establecen que solamente el péptido CTP2-CP4 EPSPS es codificado en el inserto de NK603. Además, la estabilidad genética del inserto fue demostrada mediante análisis Southern a DNA genómico de plantas de las generaciones F1 y BC5 del evento NK603.

Ver carpeta de caracterización molecular.

I.I DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS FLANQUEANTES, NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS, EXPRESIÓN DE LOS MENSAJEROS CON DEMOSTRACIÓN DE RESULTADOS.

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;

Ver inciso anterior y **Ver carpeta de caracterización molecular.**

I.J MAPA DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA, TIPO DE HERENCIA DE LOS CARACTERES, EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y SU LOCALIZACIÓN.

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;

El maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 se obtuvo mediante técnicas de cruzamiento convencional, tomando como parentales los materiales de maíz que contienen por separado cada uno de los eventos.

MON-89Ø34-3

MON 89034 fue obtenido empleando el plásmido de transformación PV-ZMIR245 que contiene dos T-DNA separados. El primer T-DNA, designado T-DNA I, contiene los casetes de expresión *cry1A.105* y *cry2Ab2*. El segundo T-DNA, designado como T-DNA II, contiene el casete de expresión *nptII*. Durante la transformación ambos T-DNAs fueron insertados en el genoma. Se utilizó mejoramiento tradicional para aislar plantas que contienen únicamente los casetes de expresión *cry1A.105* y *cry2Ab2* (T-DNA I) y que no contienen el casete de expresión *nptII* (T-DNA II) obteniendo de esta manera un maíz protegido frente al ataque de insectos libre de marcador de selección. (Ver Figura 1, Tabla 1 y Tabla 2)
(Ver carpeta de Caracterización Molecular).

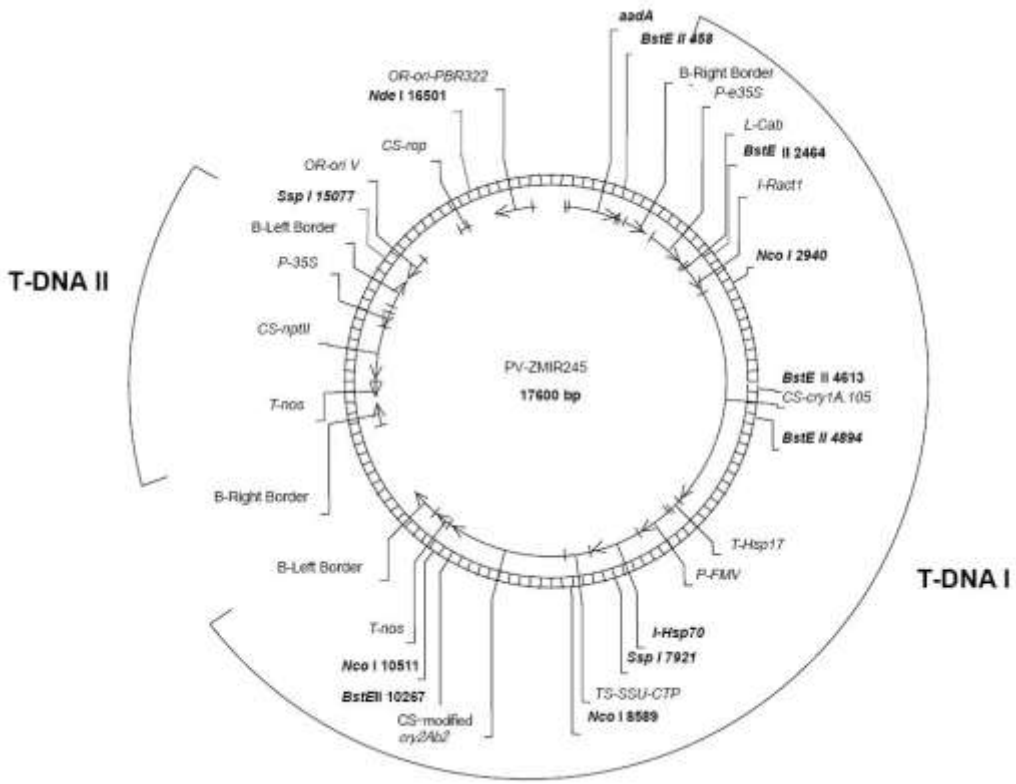


Figura 1. Mapa del plásmido PV-ZMIR245 utilizado para desarrollar el MON 89034.
En el proceso de obtención de este maíz recombinante, solo se seleccionaron a aquellos individuos que contenían la región del T-DNA I (mostrado arriba) y que no contenían la región T-DNA II.

MON-89Ø34-3

Tabla 1.- Orígenes y funciones de los elementos del plásmido PV-ZMIR245 utilizado para desarrollar el maíz recombinante MON 89034.

Elementos	**Origen y función.**
Región T-DNA I	
B[a]-Borde derecho	Fragmento de DNA que contiene el borde derecho de la nopalina región tipo T-DNA, derivada de *A. tumefaciens*. Esta secuencia del borde derecho es utilizada como punto de inicio de de transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* al genoma de la planta
P[b]-*e35S*	Promotor y 9 pb de secuencia líder del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35SRNA (Referencia 51) con la región potenciadora duplicada implicadas en la expresión constante de la región codificante del gen blanco en todos los tejidos de la planta.
L[c]-*Cab*	Región líder 5´- terminal no traducida de la proteína de unión a/b de clorofila de trigo. Activa la expresión del gen blanco.
I[d]-*Ract1*	Intrón del gen de la actina de Arroz. Activa la expresión del gen blanco.
CS[e]-*cry1A.105*	Gen que codifica la proteína Cry1A.105.
T[f]-*Hsp17*	Región 3´-terminal no traducida de la proteína de choque térmico de trigo 17.3. Termina la transcripción e induce la poliadenilación.
P[b]-*FMV*	Promotor 35S derivado del virus del mosaico de la *Scrophularia* (FMV) (Referencia 55). Involucrado en la expresión constante de la región codificante del gen en todos los tejidos de la planta.
I[d]-*Hsp70*	Primer intrón del gen de la proteína de choque térmico 70 del maíz. Activa la expresión del gen blanco.
TS[g]-*SSU-CTP*	Péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa del maíz, incluyendo la primera secuencia del intrón. Transfiere la proteína unida al péptido de tránsito hacia el cloroplasto
CS[e]-modified *cry2Ab2*	Gen que codifica la proteína Cry2Ab2 modificada derivada de *B. thuringiensis*.
T[f]-*nos*	Región 3' no transcrita de gen de la nopalina sintasa (*nos*) derivada de *A. tumefaciens*. El T-DNA termina la transcripción del RNAm e induce la poliadenilación.
B[a]-Left Border	Fragmento de DNA que contiene la secuencia del borde izquierdo (25pb) derivadas de *A. tumefaciens.* Es el punto de terminación del T-DNA de transferencia de *A. tumefaciens* hacia el genoma de la planta.

[a]B – bordo
[b]P – promotor
[c]L – líder
[d]I – intrón

[e]CS – Secuencia codificante
[f]T – secuencia de terminación de la transcripción
[g]TS – secuencia blanco

Tabla 2.- Orígenes y funciones de los elementos del plásmido PV-ZMIR245 utilizado para desarrollar el maíz recombinante MON 89034 (continuación).

Elementos	**Origen y función.**
T-DNA II región	
B-Right Border	Fragmento de DNA que contiene la secuencia del borde derecho (24 pb) del gen de la nopalina sintasa tipo T-DNA, derivado de *A. tumefaciens*. La secuencia del borde derecho se utiliza como el punto de iniciación del T-DNA de transferencia de *A. tumefaciens* al genoma de la planta.
T-*nos*	Región 3´ de transcripción de la nopalina sintasa (nos) gen derivado de *A. tumefaciens*. Termina la transcripción del RNAm e induce la poliadenilación.
CS-*nptII*	Gen derivado del transposón TN5 de *E. coli* (Referencia 61). Codifica a la neomicina fosfotransferasa II y confiera resistencia en la planta a la kanamicina. Utilizado como marcador selectivo de la planta transgénica durante la transferencia de genes.
P-*35S*	Región promotora 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Involucrado en la expresión constante del gen blanco en todos los tejidos de la planta
B-Left Border	Fragmento de DNA que contiene la secuencia del borde izquierdo (25 pb) derivadas de *A. tumefaciens*. Es el punto de terminación del T-DNA (DNA de transferencia) de *Agrobacterium tumefaciens* al genoma de la planta.
Regiones del esqueleto del plásmido	
OR[a]-*ori V*	Origen de replicación aislado del un amplio espectro de plásmidos RK2. Permite la replicación autónoma del vector en *A. tumefaciens.*
CS-*rop*	Secuencia codificante para la supresión del “primer” de la proteína para mantener el número de copias del plásmido en *E. coli.*
ORa-*ori-PBR322*	Origen de replicación aislado de pBR322. Permite la replicación autónoma del vector en *E. coli.*
aadA	Promotor bacteriano, región codificante y terminador para la 3'(9)-O-nucleotidiltransferasa, enzima aminoglicosida modificada, derivada del transposón Tn7. Confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomicina.

[a]OR – Origen de Replicación

MON-ØØ6Ø3-6

El evento NK603 fue obtenido mediante el método de aceleración de partículas, introduciendo al genoma de maíz el fragmento de restricción *MluI* del vector PV-ZMGT32 (fragmento PV-ZMGT32L).
(Ver carpeta de Caracterización Molecular).

Mapa lineal del fragmento de restricción PV-ZMGT32L, el cual fue utilizado para generar la línea de maíz NK-603 mediante la tecnología de aceleración de partículas. Las líneas punteadas representan los sitios MluI después de la digestión del plásmido PV-ZMGT32. El sitio *Xba*I 4082 no es activo debido a la metilación. (Ver Figura 2 y Tabla 3)

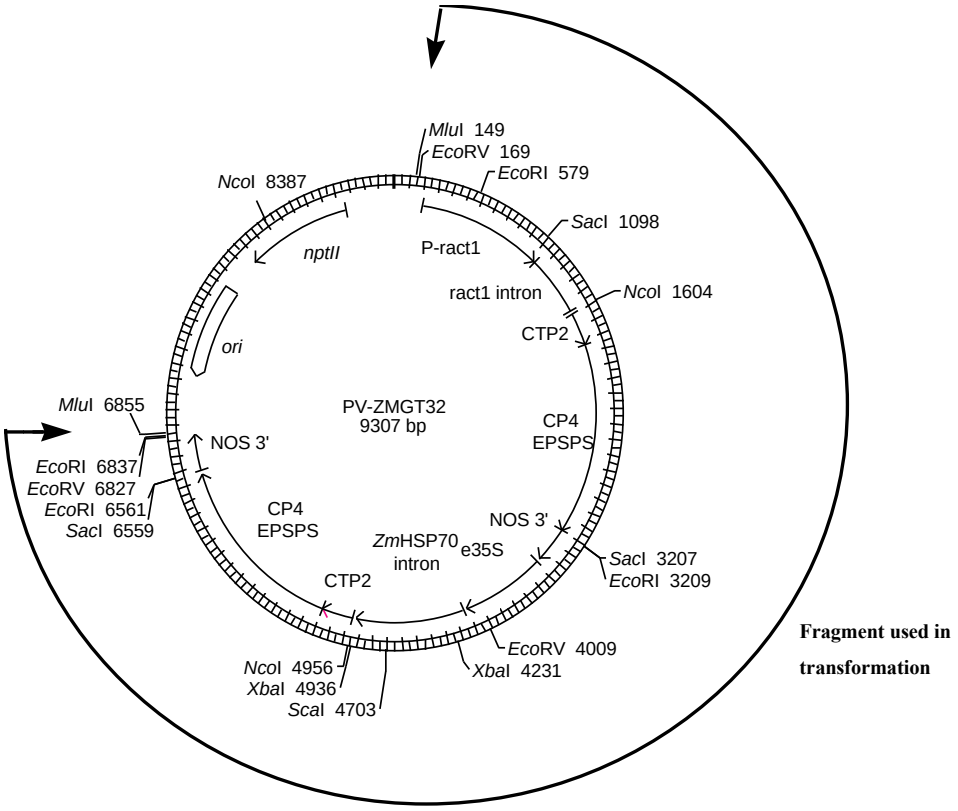


Figura 2. Mapa de la construcción genética del plásmido PV-ZMGT32.

MON-ØØ6Ø3-6

Tabla 3. Resumen de las secuencias de ADN presentes en el plásmido PV-ZMGT32.

Elemento Genético	**Fuente**	**Tamaño (Kb)**	**Función**
Elementos genéticos presentes en el fragmento de restricción designado PV-ZMGT32L utilizado en la transformación:			
Gen CP4 EPSPS Cassette (1)			
Intron P-ract1/ract1	*Oriza sativa*	1.4	Región 5' del gen actin1 de arroz conteniendo el promotor y el primer intrón (McElroy, *et al.,* 1990).
CTP2	*Arabidopsis thaliana*	0.2	Péptido de transito a cloroplasto aislado de *Arabidopsis thaliana* EPSPS, presente para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, sitio de la síntesis de aminoácidos aromáticos (Klee and Rogers, 1987).
CP4 EPSPS	*Agrobacterium sp.* cepa CP4	1.4	Secuencia de ADN que codifica la proteína CP4 EPSPS aislado de *Agrobacterium* sp. CP4 que confiere tolerancia al herbicida glifosato (Harrison *et al.,* 1993; Padgette *et. al.,* 1996)
NOS 3'	*Agrobacterium tumefasciens*	0.3	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefasciens,* la cual termina la transcripción y dirige la poliadenilación del ARNm (Fraley *et al.,* 1983).
Gen CP4 EPSPS Cassette (2)			
e35S	Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)	0.6	CaMV – Promotor del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.,* 1985) con la región potenciadora duplicada (Kay *et al.,* 1985).
Zmhsp70	*Zea mays* L.	0.8	Intrón del gen de maíz *hsp*70 (proteína de choque térmico) presente para estabilizar el nivel de transcripción (Rochester *et al.,* 1986).
CTP2	*Arabidopsis thaliana*	0.2	Péptido de transito a cloroplasto aislado de *Arabidopsis thaliana* (EPSPS), presente para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, sitio de la síntesis de aminoácidos aromáticos (Klee and Rogers, 1987).
CP4 EPSPS	*Agrobacterium sp.* cepa CP4	1.4	Secuencia de ADN que codifica la proteína CP4 EPSPS aislado de *Agrobacterium* sp. CP4 que confiere tolerancia a glifosato (Harrison *et al.,* 1993; Padgette *et. al.,* 1996)
NOS 3'	*Agrobacterium tumefasciens*	0.3	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefasciens,* la cual

			termina la transcripción y dirige la poliadenilación del ARNm (Fraley *et al.,* 1983).
Elementos genéticos presentes en la estructura del plásmido PV-ZGMT32L, pero no presentes en el fragmento de restricción *MluI* (PV-ZGMT32L) utilizado en la transformación.			
Ori	*Escherichia coli*	0.65	Origen de replicación del plásmido pUC119 de *E. coli* (Vieira and Messing, 1987).
NptII	Transposón Tn5	0.8	Gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II. Esta enzima confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos y permite la selección de las células que expresan la proteína NPTII (Beck *et al.,* 1982).

I.K DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN.

K) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN;

MON-89Ø34-3, MON-ØØ6Ø3-6 (MON89034 x NK603)

El maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 se obtuvo mediante técnicas de cruzamiento convencional, tomando como parentales los materiales de maíz que contienen por separado cada uno de los eventos.

MON-ØØ6Ø3-6 (NK 603)

El evento NK603 fue obtenido mediante el método de aceleración de partículas, introduciendo al genoma de maíz el fragmento de restricción *MluI* del vector PV-ZMGT32 (fragmento PV-ZMGT32L).

MON-89Ø34-3

Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, con el plásmido de transformación PV-ZMIR245.

I.L DESCRIPCIÓN, NÚMERO DE COPIAS, SITIOS DE INSERCIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS SECUENCIAS IRRELEVANTES PARA LA EXPRESIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA Y EN SU CASO, LA IDENTIFICACIÓN DE LOS EFECTOS NO ESPERADOS

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;

Ver inciso anterior I.H

I.M SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS Y DE LAS PROTEÍNAS NOVEDOSAS EXPRESADAS, TAMAÑO DEL PRODUCTO DEL GEN, EXPRESIÓN DE COPIAS MÚLTIPLES.

MON-89Ø34-3 (MON89034)

```
0001 MDNNPNINEC IPYNCLSNPE VEVLGGERIE TGYTPIDISL SLTQFLLSEF
0051 VPGAGFVLGL VDIIWGIFGP SQWDAFLVQI EQLINQRIEE FARNQAISRL
0101 EGLSNLYQIY AESFREWEAD PTNPALREEM RIQFNDMNSA LTTAIPLFAV
0151 QNYQVPLLSV YVQAANLHLS VLRDVSVFGQ RWGFDAATIN SRYNDLTRLI
0201  GNYTDHAVRW YNTGLERVWG PDSRDWIRYN QFRRELTLTV LDIVSLFPNY
0251  DSRTYPIRTV SQLTREIYTN PVLENFDGSF RGSAQGIEGS IRSPHLMDIL
0301 NSITIYTDAH RGEYYWSGHQ IMASPVGFSG PEFTFPLYGT MGNAAPQQRI
0351 VAQLGQGVYR TLSSTLYRRP FNIGINNQQL SVLDGTEFAY GTSSNLPSAV
0401 YRKSGTVDSL DEIPPQNNNV PPRQGFSHRL SHVSMFRSGF SNSSVSIIRA
0451 PMFSWIHRSA EFNNIIASDS ITQIPLVKAH TLQSGTTVVR GPGFTGGDIL
0501 RRTSGGPFAY TIVNINGQLP QRYRARIRYA STTNLRIYVT VAGERIFAGQ
0551 FNKTMDTGDP LTFQSFSYAT INTAFTFPMS QSSFTVGADT FSSGNEVYID
0601 RFELIPVTAT LEAEYNLERA QKAVNALFTS TNQLGLKTNV TDYHIDQVSN
0651 LVTYLSDEFC LDEKRELSEK VKHAKRLSDE RNLLQDSNFK DINRQPERGW
0701 GGSTGITIQG GDDVFKENYV TLSGTFDECY PTYLYQKIDE SKLKAFTRYQ
0751 LRGYIEDSQD LEIYSIRYNA KHETVNVPGT GSLWPLSAQS PIGKCGEPNR
0801 CAPHLEWNPD LDCSCRDGEK CAHHSHHFSL DIDVGCTDLN EDLGVWVIFK
0851 IKTQDGHARL GNLEFLEEKP LVGEALARVK RAEKKWRDKR EKLEWETNIV
0901 YKEAKESVDA LFVNSQYDQL QADTNIAMIH AADKRVHSIR EAYLPELSVI
0951 PGVNAAIFEE LEGRIFTAFS LYDARNVIKN GDFNNGLSCW NVKGHVDVEE
1001 QNNQRSVLVV PEWEAEVSQE VRVCPGRGYI LRVTAYKEGY GEGCVTIHEI
1051 ENNTDELKFS NCVEEEIYPN NTVTCNDYTV NQEEYGGAYT SRNRGYNEAP
1101 SVPADYASVY EEKSYTDGRR ENPCEFNRGY RDYTPLPVGY VTKELEYFPE
1151 TDKVWIEIGE TEGTFIVDSV ELLLMEE
```

Figura 3. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry1A.105, producida en el evento MON89034

```
001 MAPTVMMASS ATAVAPFQGL KSTASLPVAR RSSRSLGNVS NGGRIRCMQV WPAYGNKKFE
061 IRTLSYLPPL STGGRCMQAM DNSVLNSGRT TICDAYNVAA HDPFSFQHKS LDTVQKEWTE
121 WKKNNHSLYL DPIVGTVASF LLKKVGSLVG KRILSELRNL IFPSGSTNLM QDILRETEKF
181 LNQRLNTDTL ARVNAELTGL QANVEEFNRQ VDNFLNPNRN AVPLSITSSV NTMQQLFLNR
241 LPQFQMQGYQ LLLLPLFAQA ANLHLSFIRD VILNADEWGI SAATLRTYRD YLKNYTRDYS
301 NYCINTYQSA FKGLNTRLHD MLEFRTYMFL NVFEYVSIWS LFKYQSLLVS SGANLYASGS
361 GPQQTQSFTS QDWPFLYSLF QVNSNYVLNG FSGARLSNTF PNIVGLPGST TTHALLAARV
421 NYSGGISSGD IGASPFNQNF NCSTFLPPLL TPFVRSWLDS GSDREGVATV TNWQTESFET
481 TLGLRSGAFT ARGNSNYFPD YFIRNISGVP LVVRNEDLRR PLHYNEIRNI ASPSGTPGGA
521 RAYMVSVHNR KNNIHAVHEN GSMIHLAPND YTGFTISPIH ATQVNNQTRT FISEKFGNQG
681 DSLRFEQNNT TARYTLRGNG NSYNLYLRVS SIGNSTIRVT INGRVYTATN VNTTTNNDGV
701 NDNGARFSDI NIGNVVASSN SDVPLDINVT LNSGTQFDLM NIMLVPTNIS PLY
```

Figura 4. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína Cry2Ab2, producida en el evento MON89034.

- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

```
  1  MAQVSRICNG VQNPSLISNL SKSSQRKSPL SVSLKTQQHP RAYPISSSWG
 51  LKKSGMTLIG SELRPLKVMS SVSTACMLHG ASSRPATARK SSGLSGTVRI
101  PGDKSISHRS FMFGGLASGE TRITGLLEGE DVINTGKAMQ AMGARIRKEG
151  DTWIIDGVGN GGLLAPEAPL DFGNAATGCR LTMGLVGVYD FDSTFIGDAS
201  LTKRPMGRVL NPLREMGVQV KSEDGDRLPV TLRGPKTPTP ITYRVPMASA
251  QVKSAVLLAG LNTPGITTVI EPIMTRDHTE KMLQGFGANL TVETDADGVR
301  TIRLEGRGKL TGQVIDVPGD PSSTAFPLVA ALLVPGSDVT ILNVLMNPTR
351  TGLILTLQEM GADIEVINPR LAGGEDVADL RVRSSTLKGV TVPEDRAPSM
401  IDEYPILAVA AAFAEGATVM NGLEELRVKE SDRLSAVANG LKLNGVDCDE
451  GETSLVVRGR PDGKGLGNAS GAAVATHLDH RIAMSFLVMG LVSENPVTVD
501  DATMIATSFP EFMDLMAGLG AKIELSDTKA A
```

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS. Esta secuencia incluye el péptido de tránsito CTP2 (subrayado).

I.N RUTAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS EN LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN Y SUS CAMBIOS.

N) RUTAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS EN LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN Y SUS CAMBIOS;

MON 89034 X NK 603

Todos los híbridos de maíz que son desarrollados, sin importar que sean biotecnológicos o convencionales, existen como variedades híbridas F1. Los híbridos F1 se desarrollan por las compañías o instituciones públicas mediante el cruzamiento de líneas parentales elite. Este mismo proceso es empleado para combinar características que se presentan como genes apilados en el híbrido F1.

La expresión de las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 en el maíz MON 89034 confiere la característica de resistencia a plagas de insectos lepidópteros. La expresión de la proteína CP4 en las plantas de maíz confiere la característica de tolerancia frente a aspersiones totales de glifosato sobre las plantas. Estas proteínas no presentaron efecto en el metabolismo normal de la planta cuando se determinó el análisis de seguridad en cada uno de los eventos en forma individual. La expresión de estas características en un híbrido F1 con genes apilados no se espera que presente efectos interactivos o sinergísticos en el metabolismo de la planta debido a que involucran distintos modos de acción.

Las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, y CP4 EPSPS poseen diferentes modos de acción.

Las proteínas Cry1A.105 y la Cry2Ab2 expresadas en MON 89034 son proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*. Por varias décadas se han realizado extensivos estudios sobre la seguridad y modo de acción de las proteínas Cry ya sea como mezcla (tal como se usan en los plaguicidas microbianos) o como proteínas individuales (tal como en los cultivos Bt).

La investigación del mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry en los insectos blanco se ha realizado en forma típica evaluando la función de la actividad específica de las proteínas Cry en la naturaleza. El acuerdo general sobre el modo de acción de las proteínas Cry es de que las protoxinas Bt son solubilizadas en primer lugar en el intestino medio de los insectos susceptibles donde el pH es elevado (típicamente de 9 a 11 en las larvas de lepidópteros). La solubilización es seguida de la activación de las protoxinas por proteasas específicas del intestino medio que como producto generan toxinas activas. Las toxinas activadas se unen a receptores específicos de la membrana del intestino medio, se insertan en la membrana apical, formando poros que interfieren con la toma de nutrientes y eventualmente ocasionan la muerte (Gill et al., 1992; Schnepf et al., 1998; Zhuang and Gill, 2003). Estos receptores no se encuentran en células del tracto digestivo de mamíferos de tal manera que las proteínas Cry insecticidas no presentan efecto en humanos, otros mamíferos o insectos no susceptibles. Estas proteínas no presentan actividad enzimática y por lo tanto no afectan el metabolismo de la planta en manera alguna (OECD, 2007).

La proteína CP4 EPSPS, 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa, es una enzima derivada de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. El mecanismo de tolerancia a glifosato en estas plantas GM se basa en el hecho de que el único blanco fisiológico del glifosato es la EPSPS endógena- una enzima clave involucrada en la ruta del ácido shikímico de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La EPSPS participa en la ruta del corismato para formar aminoácidos aromáticos que son utilizados en la síntesis proteica (Marzabadi et al. 1996). El glifosato inhibe efectivamente la EPSPS endógena de la planta, interrumpiendo la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos que lleva a la muerte de la planta. A diferencia de la EPSPS endógena, la CP4 EPSPS expresada en las plantas GM no es inactivada por el glifosato por lo cual confiere la tolerancia al glifosato (Nida et al. 1996). Todas las plantas, bacterias y hongos contienen enzimas EPSPS, pero ésta no se encuentra en humanos y otros mamíferos ya que los mamíferos no sintetizan aminoácidos aromáticos. Con base en su ubicuidad de EPSPS en microorganismos, hongos y plantas y el mecanismo de acción de la CP4 EPSPS, no es probable que sea causa de daño para humanos o animales.

Debido a que las actividades biológicas y modo de acción de estas proteínas Bt son completamente diferentes de la proteína CP4 EPSPS, no se anticipan interacciones entre estas proteínas Bt y la proteína CP4 EPSPS.

Composición

- MON-89Ø34-3 (MON89034)

Monsanto Company ha desarrollado el maíz evento MON 89034 que produce las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 que confieren protección al daño ocasionado por el barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*) y otras plagas de insectos lepidópteros. Cry1A.105 es una proteína Cry1A modificada de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Cry2Ab2 es una proteína *B.t.* (subsp. *kurstaki*). La combinación de las proteínas insecticidas Cry2Ab2 y Cry1A.105 en una sola planta proporciona un mejor control de insectos y ofrece una herramienta adicional para el manejo de la resistencia en insectos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la composición de MON 89034 comparado con maíz convencional. Los materiales de evaluación, control y referencia empleados en este estudio fueron cultivados en cinco sitios a lo largo de los Estados Unidos durante la temporada de siembra de 2004 bajo el plan de producción 04-01-50-02 (Leafgren, 2005). El material control convencional empleado en este estudio, LH198 x LH172, tiene el fondo genético representativo de los materiales de evaluación, MON 89034, pero no contiene las proteínas Cry1A.105 ni Cry2Ab2.

Se incluyeron quince diferentes materiales de maíz convencional como referencias para proporcionar los datos que permitieron desarrollar un intervalo de tolerancia de 99% para cada compuesto analizado.

Se obtuvieron muestras de forraje y grano de todas las parcelas y fueron analizadas para determinar su composición. Los compuestos analizados fueron seleccionados con base en las recomendaciones especificadas por la OECD (OECD, 2002). Los análisis de composición para las muestras de forraje incluyeron proximales (proteína, grasa, ceniza y humedad), fibra detergente ácido (ADF), fibra detergente neutro (NDF), minerales (calcio y fósforo) y carbohidratos por cálculo. El análisis de composición a muestras de granos incluyeron proximales (proteína, grasa, ceniza y humedad), ADF, NDF, fibra dietética total (TDF), aminoácidos, ácidos grasos (C8-C22), vitaminas (B1, B2, B6, E, niacina y pacido fólico), anti-nutrientes (ácido fítico y rafinosa), metabolitos secundarios (furfural, ácido ferúlico y ácido p-cumárico), minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc) y carbohidratos por cálculo. Un total de 77 diferentes analitos (9 en forraje y 68 en grano) fueron cuantificados. De estos compuestos 16 presentaron más del 50% de las observaciones abajo del LOQ del ensayo y como resultado fueron excluidas del análisis estadístico. Por lo tanto, 61 compuestos fueron evaluados estadísticamente (9 en forraje y 52 en grano). La evaluación estadística de los datos de composición fue realizado empleando un modelo mixto de análisis de varianza en seis conjuntos de datos: análisis de datos de cada una de las 5 pruebas de campo más los datos de la combinación de todos los 5 sitios, referidos como el sitio combinado en este reporte. La evaluación estadística de los datos de composición incluyó una comparación del forraje y grano de MON 89034 con el maíz control convencional. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas para un nivel de significancia del 5% ($p<0.05$). Se realizaron 366 comparaciones estadísticas entre el material de evaluación y el control convencional (61 comparaciones en el sitio combinado y 305 comparaciones en los sitios individuales). Empleando los datos para cada componente obtenido de los 15 materiales convencionales se calculó un intervalo de tolerancia de 99% para contener, con 95% de confianza, el 99% de los valores contenidos en la población de

materiales convencionales de maíz. Para aquellas comparaciones en las que el material de evaluación fue significativamente diferente ($p<0.05$) del control, el rango de prueba fue entonces comparado con el intervalo de tolerancia del 99% para determinar si el rango de prueba se encontraba dentro del intervalo de tolerancia y por lo tanto considerado como parte de la población de maíz convencional.

El análisis estadístico combinando las localidades para MON 89034 mostró diferencias estadísticamente significativas para tres analitos. Para dos de estos tres analitos también se presentaron diferencias estadísticamente significativas en más de uno de los sitios individuales. Para el otro analito se presentó diferencia estadística en solamente uno de los sitios individuales. El análisis estadístico de MON 89034 a partir de los 5 sitios individuales mostró que 11 analitos eran estadísticamente diferentes al control en más de un sitio individual y 33 analitos fueron estadísticamente diferentes del control en solamente un sitio. Todas las medias y el rango de valores de las sustancias evaluadas se encontraron dentro del rango de valores obtenido ya sea del intervalo de tolerancia de 99% y/o los rangos del banco de datos de composición de ILSI (ILSI Crop Composition Database), por lo tanto estas diferencias no se consideraron como biológicamente relevantes.

Composición

- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

Monsanto Company ha desarrollado el maíz evento NK 603 que es tolerante a glifosato (el ingrediente activo de los herbicidas agrícolas de la familia Faena) a niveles de aplicación comercial. El maíz evento NK 603 contiene la proteína 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 (CP4 EPSPS). Los maíces que han demostrado un nivel de tolerancia comercial al herbicida Faena® se denominan en México Solución Faena. El gen *cp4 epsps* de Agrobacterium sp. cepa CP4 se ha secuenciado completamente y codifica para una proteína ~ 47.6 kDa que consiste en un péptido sencillo de 455 aminoácidos (Padgette et al., 1995; Padgette et al., 1996). La proteína CP4 EPSPS es funcionalmente similar a las enzimas vegetales EPSPS pero posee una menor afinidad al glifosato (Padgette et al., 1993; Padgette et al., 1995). En las plantas convencionales el glifosato se une a la enzima EPSPS y bloquea la biosíntesis de aminoácidos aromáticos privando de esta manera a las plantas de estos nutrientes esenciales (Steinrucken and Amrhein, 1980; Haslam, 1993). En el maíz evento NK 603, los requerimientos nutricionales para un crecimiento y desarrollo normales se satisfacen por la acción continua de la enzima tolerante a glifosato CP4 EPSPS en la presencia de glifosato. Se ha descrito en la literatura el análisis de inocuidad exhaustivo a la proteína CP4 EPSPS (Harrison et al., 1996; Padgette et al., 1996). La caracterización molecular en detalle del evento NK 603 se incluye en los estudios de Deng et al., 1999.

El propósito del presente estudio fue realizar el análisis de composición en tejidos clave de maíz colectados a partir de maíz transgénico NK 603 evento NK 603 (LH82xNK603+/B73BC2S2), la línea parental convencional (LH82xB73BC2S2) y 19 híbridos comerciales de maíz convencional crecidos bajo condiciones de campo. Las evaluaciones de

campo se realizaron en la Unión Europea durante 1999 con repeticiones en cuatro sitios localizados en Germignonville, Francia (Sitio FN-1); Janville, Francia (Sitio FN-2); L'Isle Jourdain, Francia (Sitio FS-3); y Bagnarola, Italia (Sitio IT-4). Se sembraron en todos los sitios el maíz evento NK 603 y su línea control. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar en los sitios FS-3 y en IT-4. Ara los sitios FN-1 y FN-2 las parcelas de NK 603 no se ubicaron en el mismo bloque que las parcelas control de materiales convencionales debido a limitaciones de espacio y por lo tanto se utilizó un diseño de bloque incompleto (tratado/sin tratar) para estos dos sitios. Se colectaron de todos los sitios forraje y grano. Se realizaron análisis de composición cuantificando para grano proximales (proteína, grasa, ceniza, humedad), fibra detergente ácido (ADF), fibra detergente neutro (NDF), aminoácidos, ácidos grasos, vitamina E, minerales (calcio, cobre, fierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc), ácido fítico y contenido de inhibidor de tripsina; y para forraje proximales, ADF, NDF. Además, el contenido de carbohidratos en forraje y granos fue determinado por cálculo. En total, se evaluaron 51 compuestos (7 en forraje y 44 en grano) como parte del análisis de inocuidad y nutricional del maíz evento NK 603.

Se realizaron análisis estadísticos a los datos de composición empleando un modelo analítico de varianza para bloques completos al azar para tres conjuntos de comparaciones: análisis de datos de pruebas replicadas en los sitios FS-3 y IT-4 y los datos de una combinación de ambas pruebas. Como fueron evaluados 51 compuestos, se realizó un total de 153 comparaciones: 51 comparaciones para cada uno de los tres análisis estadísticos. El evento de prueba, NK 603, fue comparado con el híbrido control no transgénico para determinar diferencias estadísticamente significativas a $p<0.05$. Además, la comparación de NK 603 con un intervalo de confianza del 95% para las referencias de híbridos comerciales fue realizada para determinar si el rango de valores de NK 603 se encontraba dentro de la población de maíces comerciales. Debido a que un diseño de bloques completamente al azar no era posible para las réplicas de los sitios FN-1 y FN-2, la estadística descriptiva que incluye medias, errores estándar (S.E.) y el rango de valores fueron determinados para estas evaluaciones.

Los resultados de análisis de composición mostraron que los 51 compuestos cuantificados en el maíz evento NK 603 se encontraban ya sea dentro del rango observado para maíces comerciales plantados en los mismos sitios en la Unión Europea en 1999, se encontraban dentro de los rangos publicados en la (Jugenheimer, 1976; Watson,1982; Watson, 1987), o se encontraban dentro de los rangos históricos de variedades de maíz convencionales (Sanders and Patzer, 1995; Sanders et al., 1996a,b; 1997a,b,c). No se presentaron diferencias estadísticas significativas en 126 de las 153 comparaciones realizadas entre el maíz evento NK 603 y la línea control no transgénica que incluyó los niveles de compuestos para forraje (humedad, grasa, proteína, ceniza, carbohidratos, ADF y NDF) y compuestos del grano (ceniza, humedad, ADF, NDF, siete de los 18 aminoácidos, dos de los ocho ácidos grasos, cinco de los ocho minerales, vitamina E y el inhibidor de tripsina). Las medias y errores estándar de los sitios FN-1 y FN-2 con un diseño de bloque incompleto (tratado/sin tratar) fueron consistentes con lo obtenido en los sitios FS-3 y IT-4.

De las 27 comparaciones que se encontraron ser estadísticamente diferentes, el 5% o aproximadamente ocho (0.05 x 153) se esperaban ser falsos positivos basados simplemente en

la probabilidad. Las diferencias observadas únicamente en una de las dos comparaciones y que no eran consistentes a lo largo de las tres comparaciones es improbable que sean de significancia biológica. Las diferencias entre el evento de prueba y la línea control expresado como porcentaje de los valores control se ubicaron entre el 1.13% y el 22.93%. Además, el rango de valores para estos compuestos de composición asociados con las pequeñas diferencias estadísticas se encontró que se ubicaban dentro del intervalo de tolerancia de 95% para variedades comerciales cultivadas en los mismos sitios de la Unión Europea en 1999. Esto demuestra, con un intervalo de confianza del 95%, que los niveles de compuestos clave y otros constituyentes bioquímicos del NK 603 se ubicaron dentro de la misma población tal como se esperaba para el maíz comercial no transgénico empleado como referencia en este estudio. Por lo tanto, estas pequeñas diferencias es improbable que sean biológicamente significativas y se considera que el forraje y grano de NK 603 es equivalente en composición al grano y forraje de maíz convencional.

Estos datos apoyan la conclusión de que el maíz Solución Faena evento NK 603 es equivalente en composición y tan seguro y nutritivo como las variedades de maíz cultivadas comercialmente en la actualidad.

Ver carpeta de composición.

Alergenicidad

- MON-89Ø34-3 (MON89034)

Los resultados de análisis bioinformáticos extensivos empleando el algoritmo FASTA para el alineamiento de secuencias y una ventana de 8 residuos mostró que las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 no comparten similitud en secuencia aminoacídica con proteínas alergénicas conocidas, gliadinas, glutelinas o proteínas tóxicas que ocasionan efectos adversos en mamíferos.

Ver carpeta de Alergenicidad.

Alergenicidad

- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

Actualización de la evaluación bioinformática de la proteína CP4 EPSPS empleando la base de datos AD8

La evaluación bioinformática de la CP4 EPSPS se ha realizado en varias ocasiones a lo largo del proceso de investigación y desarrollo, con el más reciente reporte (McClain and Silvanovich, 2007) concluyendo que la proteína CP4 EPSPS no era similar a alérgenos conocidos, toxinas u otras proteínas que pueden afectar negativamente la salud humana o animal.

En forma periódica se actualizan las bases de datos empleadas para la evaluación de las proteínas. Desde que se completó el reporte más reciente, se ha revisado y publicado la base de datos de alérgenos (FARRP, 2008). Con la finalidad de determinar si la proteína CP4

EPSPS comparte similitud de secuencia significativa con las nuevas secuencias que contiene la base de datos actualizada de alérgenos, se utilizó la proteína CP4 EPSPS para una búsqueda con los algoritmos FASTA y ALLERGENSEARCH empleando la base de datos Allergen, versión 8.0 (AD8).

Los resultados indican que no se observaron similitudes estructurales biológicamente relevantes con alérgenos por parte de la secuencia proteica de la CP4 EPSPS. Además, no se comparte identidad de secuencias peptídicas cortas (ocho aminoácidos) entre la proteína CP4 EPSPS y proteínas del banco de datos actualizado. Estos resultados indican la carencia de similitud estructural e inmunológica relevante entre la proteína CP4 EPSPS y alérgenos.

Ver carpeta de Alergenicidad.

I.O PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA PROTEÍNA CODIFICADA POR EL TRANSGÉN EN SUBPRODUCTOS.

O) PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA PROTEÍNA CODIFICADA POR EL TRANSGEN EN SUBPRODUCTOS;

En el evento MON 89034 la proteína insecticida Cry2Ab2 se dirige a cloroplasto al igual que las proteínas CP4 EPSPS del evento MON 00603. La ubicación de las proteínas en el cloroplasto de estos maíces biotecnológicos es mediado por el péptido de tránsito al organelo (la proteína de interés se produce como una proteína de fusión con el péptido de tránsito al organelo). En el evento MON 89034 la proteína Cry2Ab2 se dirige a cloroplasto empleando el péptido de tránsito a cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa de maíz (Matsuoka,*et al*., 1987) mientras que en el MON 00603 se utiliza el péptido de tránsito a cloroplasto de la EPSPS de Arabidopsis (Klee and Rogers, 1987). El péptido de tránsito será removido de la proteína de fusión y eliminado inmediatamente por proteasas endógenas después de que la proteína de interés es transferida al plástido.

I.P SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LAS SECUENCIAS REGULADORAS (PROMOTORES, TERMINADORES Y OTRAS), DESCRIPCIÓN, NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS, PERTENENCIA DE ESTAS SECUENCIAS A LA ESPECIE RECEPTORA, INCLUSIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS HOMÓLOGAS A LA ESPECIE RECEPTORA.

P) SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LAS SECUENCIAS REGULADORAS INCLUYENDO PROMOTORES, TERMINADORES Y OTRAS, Y SU DESCRIPCIÓN, NÚMERO DE COPIAS INSERTADAS, PERTENENCIA DE ÉSTAS SECUENCIAS A LA ESPECIE RECEPTORA, INCLUSIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS HOMÓLOGAS A LA ESPECIE RECEPTORA;

Ver apartado J.

I.Q PATOGENICIDAD O VIRULENCIA DE LOS ORGANISMOS RECEPTORES Y DONADORES.

Q) PATOGENICIDAD O VIRULENCIA DE LOS ORGANISMOS DONADORES Y RECEPTORES;

a) MON-89Ø34-3
Organismo donador
Bacillus thuringiensis subsp. *Kurstaki*
Gen transferido. *cry2AB, cry1A.105*

Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva, facultativa anaeróbica que forma inclusiones de proteína adyacente a la endospora. Las subespecies de Bt pueden sintetizar más de una inclusión parasporal. Estas inclusiones están formadas por diferentes proteínas cristal insecticida (PCI).

i. Ciclo de vida o modo de acción.
Los cristales o el complejo de espora/cristal de un Bt esporulado deben ser ingerido por las larvas susceptibles. La eficacia de los cristales en el intestino medio del insecto depende de la solubilización de los cristales, de la conversión de la pro toxina a la toxina biológicamente activa por las enzimas proteolítica, de los receptores específicos ensamblado por el dominio terminal-C de la toxina activa y la formación de un poro por el dominio terminal-N con el rompimiento de las células epiteliales. La germinación de la espora y la proliferación de las células vegetativas dentro del homocelo del insecto podrían resultar en una septicemia contribuyendo a la muerte del insecto. Los receptores ensamblados por el cristal es el principal determinante de la especificidad del hospedero debido a la existencia de diferentes cristales presentes en cada una de las cepas de Bt.

ii. Hospederos.
Bacillus thuringiensis subespecies *kurstaki* (B.t.k.). Esta cepa controla insectos plagas por la producción de las proteínas cristal insecticida conocidas como delta-endotoxinas. La proteína delta-endotoxina producida por varias subespecies de Bt exhiben diferencias en la secuencia de aminoácidos para el dominio terminal amino de las proteínas. Estas diferencias son importantes en la acción selectiva contra ciertas insectos plagas. Lo más importante, la acción de la proteína de Bt no tienen efecto contra organismos no blancos tales como los peces, aves y mamíferos debido a que tienen los receptores en el intestino medio. Esto explica la ausencia de toxicidad de la proteína delta-endotoxina de B.t.k. a los organismos no blancos. La proteína B.t.k. expresada en el maíz muestra especificidad solamente a los insectos del orden lepidóptera y no tiene ningún efecto dañino sobre los organismos no blancos.

iii. Descripción de las etapas de desarrollo.
Muchas de las subespecies de Bt se han aislados de larvas muertas principalmente de Coleóptera, Díptera y Lepidóptera, pero muchas de las subespecies se han aislados del suelo, de las superficies de las hojas y de otros hábitats. Los insectos muertos frecuentemente contienen grandes cantidades de esporas y cristales que pueden entrar al ambiente. Las subespecies de Bt que son activas contra coleópteros y lepidópteros están asociadas con el suelo y las superficies de las hojas, mientras que las subespecies activas contra dípteros se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos. En el ambiente, las esporas persisten y el crecimiento vegetativo podría ocurrir cuando las condiciones son favorables y los nutrientes están disponibles.

b) MON-ØØ6Ø3-6 (NK 603)
Organismo donador
Agrobacterium sp. cepa CP4
Gen transferido. CP4 EPSPS

El **organismo donador** del gen que codifica la enzima CP4 EPSPS tolerante al herbicida Faena Fuerte con Transorb® es la bacteria *Agrobacterium sp*. cepa CP4. Este gen tiene el potencial de proveer un alto nivel de protección frente a la inhibición que el herbicida ocasiona cuando es aplicado a las plantas (Padgette *et. al*., 1993)

La bacteria *Agrobacterium sp*. cepa CP4 es un microorganismo presente comúnmente en el suelo y en la rizosfera de las plantas; las Agrobacterias son bacterias aeróbicas en forma de bacilos, gramnegativas, flageladas, peritricas; forma colonias mucoides y blancas. La composición de bases de DNA varía de 58 a 63.5% GC. Cuando *Agrobacterium* es aislada de las raíces de las plantas en ambientes naturales o bajo cultivo, la mayoría de las cepas (más del 90%) no son patogénicas, aún cuando muchos aislamientos son hechos de plantas enfermas. Por lo tanto, *Agrobacterium* es esencialmente un habitante de la rizosfera y únicamente una proporción muy pequeña de aislamientos son fitopatógenos (contienen el plásmido Ti), las cuales causan la enfermedad conocida como agalla de la corona en un amplio número de plantas dicotiledóneas especialmente rosáceas como manzana, pera, durazno, cereza, almendra, frambuesa y rosal. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de un tumor al nivel del suelo y aunque reduce el valor comercial de la cosecha, generalmente no causa problemas serios en plantas maduras bien establecidas.

Únicamente el gen *CP4 EPSPS* de esta bacteria fue transferido para producir el evento NK603 de maíz tolerantes al herbicida Faena Fuerte con Transorb. La secuencia del ADN transferido y de la proteína producida es completamente conocida y se encuentra presente en todas las plantas y en la mayoría de los microorganismos que comúnmente son parte de nuestra dieta, y no existe evidencia de que esta proteína pueda causar algún efecto negativo en la salud humana o de cualquier otro vertebrado.

I.R GENES DE SELECCIÓN UTILIZADOS DURANTE EL DESARROLLO DEL OGM Y EL FENOTÍPO QUE CONFIERE ESTOS GENES DE SELECCIÓN, INCLUYENDO EL MECANISMO DE ACCIÓN DE ESTOS GENES.

R) GENES DE SELECCIÓN UTILIZADOS DURANTE EL DESARROLLO DEL OGM Y EL FENOTIPO QUE CONFIERE ESTOS GENES DE SELECCIÓN, INCLUYENDO EL MECANISMO DE ACCIÓN DE ÉSTOS GENES;

El maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 se obtuvo mediante técnicas de cruzamiento convencional, tomando como parentales los materiales de maíz que contienen por separado cada uno de los eventos, no emplea un gen de selección diferente al que le brinda la característica deseada.

MON-89Ø34-3
Fue obtenido empleando el plásmido de transformación PV-ZMIR245 que contiene dos T-DNA separados. El primer T-DNA, designado T-DNA I, contiene los cassettes de expresión *cry1A.105* y *cry2Ab2*. El segundo T-DNA, designado como T-DNA II, contiene el cassette de expresión *nptII*. Durante la transformación ambos T-DNAs fueron insertados en el genoma. Se utilizó mejoramiento tradicional para aislar plantas que contienen únicamente los cassettes

de expresión *cry1A.105* y *cry2Ab2* (T-DNA I) y que no contienen el cassette de expresión *nptII* (T-DNA II) obteniendo de esta manera un maíz protegido frente al ataque de insectos libre de marcador de selección.

I.S NÚMERO DE GENERACIONES QUE MOSTRARON ESTABILIDAD EN LA HERENCIA DEL TRANSGÉN.

S) NÚMERO DE GENERACIONES QUE MOSTRARON ESTABILIDAD EN LA HERENCIA DEL TRANSGEN, Y

El maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 se obtuvo mediante técnicas de cruzamiento convencional, tomando como parentales los materiales de maíz que contienen por separado cada uno de los eventos.

Estabilidad
- MON-89Ø34-3 (MON89034)
Análisis de la presencia de las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 en muestras de hojas y semillas de múltiples generaciones de MON 89034 mediante análisis Western

Monsanto Company ha desarrollado el maíz evento MON 89034 que produce las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 que confieren protección al daño ocasionado por el barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*) y otras plagas de insectos lepidópteros. Cry1A.105 es una proteína Cry1A modificada de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Cry2Ab2 es una proteína *B.t.* (subsp. *kurstaki*). La combinación de las proteínas insecticidas Cry2Ab2 y Cry1A.105 en una sola planta proporciona un mejor control de insectos y ofrece una herramienta adicional para el manejo de la resistencia en insectos.

El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 en tejido foliar y de semillas de MON 89034 a lo largo de diferentes generaciones de cruzamientos mediante análisis Western.

Con anticuerpos policlonales específicos para la proteína Cry1A.105 el análisis Western demostró la presencia de la proteína Cry1A.105 en tejido proveniente de seis generaciones de MON 89034. Además, la proteína Cry1A.105 producida por la planta posee el mismo peso molecular que la proteína estándar de referencia Cry1A.105 producida en *E. coli*. Tal como se esperaba, la proteína Cry1A.105 no se encontró en las muestras control de hojas y granos.

Con anticuerpos policlonales específicos para la proteína Cry2Ab2 el análisis Western demostró la presencia de la proteína Cry2Ab2 en tejido proveniente de seis generaciones de MON 89034. Además, la proteína Cry2Ab2 producida por la planta posee el mismo peso molecular que la proteína estándar de referencia Cry2Ab2 producida en *E. coli*. Tal como se esperaba, la proteína Cry2Ab2 no se encontró en las muestras control de hojas y granos.

Estabilidad
- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

La caracterización molecular del maíz Roundup Ready evento NK 603 (identificador único MON-ØØ6Ø3-6) se ha descrito en detalle previamente (Deng et al., 1999). Esta caracterización demostró que una copia completa del fragmento de DNA empleada para la

transformación estaba presente en el genoma del maíz evento NK 603, junto con un fragmento de 217 pb conteniendo una porción de la región potenciadora del promotor actina de arroz unido en posición invertida del extremo 3´ del casete de transformación insertado. El propósito de este estudio fue realizar el análisis de Southern para identificar la huella de hibridación a lo largo de siete generaciones de maíz Roundup Ready que contienen el evento NK 603, empleando la restricción con la enzima Eco RV y como sonda con la región codificante para CTP2-CP4-EPSPS a fin de estimar la estabilidad genética del DNA integrado a lo largo de todas las cinco ramificaciones del árbol de mejoramiento. Los datos muestran que todas las generaciones analizadas dieron bandas de tamaño esperado y no se observaron diferencias en el patrón de bandas entre el DNA que se extrajo de cualquiera de las siete generaciones. Estos resultados demuestran la estabilidad del DNA insertado en siete generaciones que contienen el evento NK 603 que representan cinco ramas del árbol de mejoramiento.

Ver carpeta de estabilidad

I.T REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA SOBRE LOS DATOS PRESENTADOS

T) REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA SOBRE LOS DATOS PRESENTADOS.

Ver apartado “I”

II. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DONDE SE PRETENDA LIBERAR EL OGM

Las zonas donde se pretende liberar al medio ambiente es en campos de agricultores cooperantes (Tabla 5), bajo la supervisión de: instituciones de investigación reconocidas, públicas (gubernamentales) y/o privadas, como el INIFAP (Tabla 4) y MONSANTO, especializadas en la materia, en el estado de Sonora de acuerdo con el ciclo de siembra y cosecha para la región.

ESTADO	CICLO	VENTANA DE SIEMBRA	VENTANA DE COSECHA
Sonora	**OI**	15 agosto 2009 - 23 de octubre de 2009	12 de enero de 2010 – 22 de marzo de 2010

Tabla 4. Zona donde se pretende liberar al medio ambiente, en campos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Sonora. **Ciclo Otoño-Invierno (OI) 2009.**

INIFAP		**MUNICIPIO**	**Periodo de Siembra**	**COORDENADAS GEOGRÁFICAS (GRADOS)**		**SUPERFICIE (Ha),**
	Dirección			Latitud °	Longitud°	***Aislamiento de 200 a 500 metros.**
CIR Noreste / Campo Experimental /Valle del Yaqui	CALLE DR. NORMAN E. BORLAUG KM. 12, VALLE DEL YAQUI, CAJEME, CD. OBREGON Teléfono: 01-644-4145700	Río Bravo	Enero-Febrero 2009	25.9647°	-98.0175°	2

* La distancia de aislamiento se propone en base a la información de estudios publicados en revistas arbitradas. Ver anexo 2. **INFORMACIÓN DE SOPORTE PARA LA DISTANCIA PROPUESTA DE ASILAMIENTO.**

Tabla 5. Las zonas donde se pretende liberar al medio ambiente son en campos de agricultores cooperantes.

AGRICULTOR COOPERANTE	**MUNICIPIO**	**Periodo de Siembra**	**COORDENADAS GEOGRÁFICAS (GRADOS)**		**SUPERFICIE (Ha),**
			Latitud ° (N)	Longitud ° (O)	****Estos predios cuentan con un aislamiento de otros cultivos de maíz de 200 a 500 metros.**
1	Cajeme	15 agosto 2009 - 23 de octubre de 2009	27.1438	109.974	2
2	Cajeme	15 agosto 2009 - 23 de octubre de 2009	27.2763	110.015	2
3	San Ignacio Río Muerto	15 agosto 2009 - 23 de octubre de 2009	27.4097	110.262	2
4	San Ignacio Río Muerto	15 agosto 2009 - 23 de octubre de 2009	27.3592	110.271	2
5	Bácum	15 agosto 2009 - 23 de octubre de 2009	27.4648	110.133	2

* La distancia de aislamiento se propone en base a la información de estudios publicados en revistas arbitradas. Ver anexo 2. **INFORMACIÓN DE SOPORTE PARA LA DISTANCIA PROPUESTA DE ASILAMIENTO.**

Ver inciso siguiente II.C

II.A SUPERFICIE TOTAL DEL POLÍGONO O POLÍGONOS DONDE SE REALIZARÁ LA LIBERACIÓN.

El polígono general se describe a continuación en la Figura 6.

Dentro de este polígono se encuentran los predios agrícolas

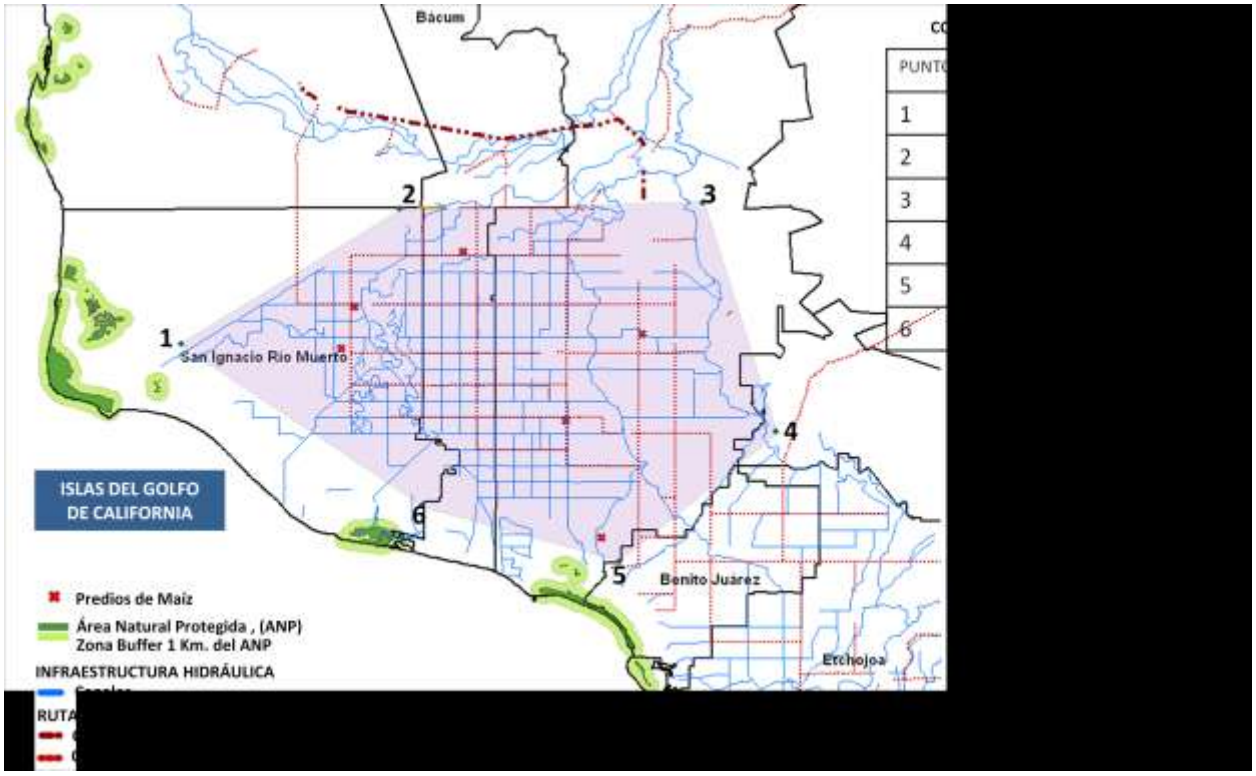
II.B UBICACIÓN DEL POLÍGONO O POLÍGONOS DONDE SE REALIZARÁ LA LIBERACIÓN

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:

Ver figura 6.

II.C DESCRIPCIÓN DE LOS POLÍOGONOS DONDE SE REALIZARÁ LA LIBERACIÓN Y DE LAS ZONAS VECINAS SEGÚN CARACTERÍSTICAS DE DISEMINACIÓN.

Figura 6. Mapa de Ubicación de las Localidades de Maíz GM en el Estado de Sonora.



El polígono mostrado es informativo de las regiones donde posiblemente se estaría liberando al ambiente maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6.

II.C.1 LISTADO DE ESPECIES SEXUALMENTE COMPATIBLES Y DE LAS ESPECIES QUE TENGAN INTERACCIÓN EN EL ÁREA DE LIBERACIÓN Y EN ZONAS VECINAS A ÉSTOS.

1. LISTADO DE ESPECIES SEXUALMENTE COMPATIBLES Y DE LAS ESPECIES QUE TENGAN INTERACCIÓN EN EL ÁREA DE LIBERACIÓN Y EN ZONAS VECINAS A ÉSTOS;

TASA DE ENTRECRUZAMIENTO ENTRE MIEMBROS DEL GÉNERO ZEA

La tasa de entrecruzamiento entre miembros del género Zea depende de (1) la compatibilidad genética, (2) distancia de aislamiento, (3) aislamiento por fechas de siembra, (4) biología de la inflorescencias masculina y femenina y (5) las condiciones ambientales presentes al momento de la polinización (por ejemplo: temperatura, humedad relativa, potencial atmosférico del agua).

El maíz cultivado se puede entrecruzar con variedades de polinización abierta y razas locales (Castillo y Goodman, 1997; Cervantes, 1998).

El maíz cultivado puede entrecruzarse con el teocintle siempre y cuando se cumplan ciertas condiciones. La primera condición es la compatibilidad genética entre el maíz cultivado y el teocintle (*Zea* spp.) (Castro Gil, 1970; Kermicle, 2001; Baltazar et al., 2005). Castro Gill (1970) polinizó numerosas razas de México y Centro América con una mezcla de teocintle de Chalco y Guerrero. El reportó que la mitad de las mazorcas no produjeron grano y concluyó que la competencia del polen fue probablemente la causa principal de la falta de producción de semillas híbridas (maíz – teocintle) en las mazorcas polinizadas. Resultados similares fueron reportados por Baltazar et al., (2005) donde se obtuvieron diferentes números de semilla en mazorcas de razas locales y maíces híbridos, polinizadas con polen de teocintle (ssp. *mexicana).* Kermicle (1997) y Lino de la Cruz (2007) reportaron que la incompatibilidad del sistema *Ga1-s* está presente en razas locales de maíz y teocintles, por lo tanto, es posible que la falta de polinización en los estudios realizados por Castro (1996) y Baltazar et al. (2005) se debieran a la presencia de *Gal-s.*

Experimentos de entrecruzamiento entre maíz y teocintle ssp. *mexicana* han evidenciado la dificultad de que el polen de maíz polinice las estigmas del teocintle (Kato, 1997; Evans and Kermicle 2001; Baltazar et al., 2005). Evans y Kermicle (2001) demostraron que cuando se aplica polen de teocintle a estigmas de maíz, se producen híbridos entre las dos sub-especies. Sin embrago, cuando estigmas de teocintle son polinizados con polen de maíz, las plantas de teocintle ssp. *mexicana* (razas de Chalco y Meseta Central) producen de manera muy inconsistente o no producen semilla. Estos investigadores determinaron que la incompatibilidad entre el teocintle y el maíz se encuentra bajo el control del gen barrera del cruzamiento del teocintle (*Teosinte crossing barrier 1, Tcb*1), localizado en el brazo corto del cromosoma 4. Debido a la ausencia de polinización recíproca. Evans y Kermicle (2001) sugirieron que *Tcb1* “podría jugar un papel significativo en el aislamiento reproductivo del teocintle de maíz” en áreas de México y Guatemala donde el teocintle y el maíz crecen de manera simpátrica.

Baltazar et al. (2005) reportaron resultados similares en México. En este estudio, varias características de de plantas de teocintle fueron reportadas que podían disminuir la polinización de la planta del teocintle por otras taxa. El teocintle produce un gran volumen de polen y tiene un reducido número de estigmas en relación al maíz. El teocintle típicamente libera el polen con un gran número de espigas que emergen asincrónicamente durante un periodo de

aproximadamente 15 días, en comparado con los 5 días de liberación para un híbrido comercial de cruza simple. El teocintle frecuentemente produce ramificaciones laterales con estigmas próximos a las espigas terminales. Estos factores incrementan substancialmente la probabilidad de que el polen del teocintle fertilice los estigmas del teocintle y reduce la probabilidad de que el teocintle sea polinizado por el maíz. En contraste, Ellstrand et al. (2007) reportaron un entrecruzamiento del 50% entre el maíz y el teocintle ssp. *parviglumis*, sugiriendo que las barreras presente en el teocintle ssp. *mexicana* no están presentes en el teocintle ssp. *parviglumis*.

El aislamiento espacial y temporal es otra condición para mantener al maíz y al teocintle como entidades separadas. De acuerdo con Wilkes (1967) la temporada de crecimiento típica del teocintle en México es de junio a noviembre. Las semillas germinan con el inicio de las lluvias de verano y crecen de forma paralela, pero más tarde que los maíces locales cultivados. La floración ocurre en septiembre - octubre y las semillas maduran en noviembre. Como resultado, el teocintle y el maíz se pueden considerar aislados temporalmente en la mayoría de los sitios en donde aparecen juntos, sin embrago, el aislamiento no es completo.

II.C.2 DESCRIPCIÓN GEOGRÁFICA

Características Agro climáticas y Agro ecológicas:

Clima:	Subtrópico Árido Cálido
Temperatura Media Anual:	31.0° C
Temperatura Maxima Media Anual:	39.4° C
Temperatura Minima Media Anual:	20.2° C
Precipitación Media Anual:	277 MM

II.C.3 PLANO DE UBICACIÓN SEÑALANDO VÍAS DE COMUNICACIÓN

3. PLANO DE UBICACIÓN SEÑALANDO LAS PRINCIPALES VÍAS DE COMUNICACIÓN.

Ver inciso anterior “C”

III. IDENTIFICACIÓN DE LOS POSIBLES RIESGOS QUE LA LIBERACIÓN DE LOS OGMS PUDIERA GENERAR AL MEDIO AMBIENTE Y A LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

III.A ESTABILIDAD DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DEL OGM.

A) ESTABILIDAD DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DEL OGM;

Ver apartado S.

III.B EXPRESIÓN DEL GEN INTRODUCIDO, INCLUYENDO NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EN DIVERSOS TEJIDOS, ASÍ COMO LOS RESULTADOS QUE LO DEMUESTREN.

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;

Niveles de expresión
- MON-89Ø34-3 (MON89034)

Monsanto Company ha desarrollado el maíz evento MON 89034 que produce las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 que confieren protección al daño ocasionado por el barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*) y otras plagas de insectos lepidópteros. Cry1A.105 es una proteína Cry1A modificada de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Cry2Ab2 es una proteína *B.t.* (subsp. *kurstaki*). La combinación de las proteínas insecticidas Cry2Ab2 y Cry1A.105 en una sola planta proporciona un mejor control de insectos y ofrece una herramienta adicional para el manejo de la resistencia en insectos.

El propósito de este estudio fue determinar los niveles de las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 mediante análisis de enzima unida a inmuno absorbente validado (ELISA) en tejidos de maíz colectado a partir de MON 89034 producido en ensayo de campo en los Estados Unidos. Muestras de tejidos fueron colectados a partir de plantas crecidas en los Estados Unidos en 5 sitios en 2005 bajo el plan de producción 05-01-50-02. En este estudio se utilizaron para análisis ELISA hojas a lo largo del cultivo (OSL-1-4), raíces a lo largo del cultivo (OSR-1-4), planta completa a lo largo del cultivo (OSWP-1-4), forraje, rastrojo, tejido de raíz, raíz senescente, anteras, polen y tejido de granos. Las muestras a lo largo del cultivo (hojas, raíz y planta completa) fueron colectadas cuatro veces en diferentes estadios de desarrollo: (1) estadio V2 – V4, (2) estadio V6 – V8, (3) estadio V10 – V12, y (4) estadio pre-VT. Todos los niveles de proteínas para todos los tipos de tejidos fueron calculados en base a microgramos (µg) por gramo (g) de peso fresco (fwt). El contenido de humedad fue determinado en todos los tipos de tejido y todos los niveles de proteínas fueron convertidos y reportados en base a peso seco (dwt).

Los niveles medios de la proteína Cry1A.105 a lo largo de todos los sitios fue de 5.9 µg/g dwt en grano, 42 µg/g dwt en forraje, 12 µg/g dwt en polen, 520 µg/g dwt en OSL-1, 120 µg/g dwt en hojas OSL-4, 12 µg/g dwt en forraje de raíz, y 50 µg/g dwt en rastrojo. En tejidos obtenidos a lo largo del ciclo de cultivo los niveles medios de la proteína Cry1A.105 a lo largo de todos los sitios fueron de 72-520 µg/g dwt en hoja, 42-79 µg/g dwt en raíz, y 100-380 µg/g dwt en la planta completa.

Los niveles medios de la proteína Cry2Ab2 a lo largo de todos los sitios fue de 1.3 µg/g dwt en grano, 38 µg/g dwt en forraje, 0.64 µg/g dwt en polen, 180 µg/g dwt en OSL-1, 160 µg/g dwt en hojas OSL-4, 21 µg/g dwt en forraje de raíz, y 62 µg/g dwt en rastrojo. En tejidos obtenidos a lo largo del ciclo de cultivo los niveles medios de la proteína Cry2Ab2 a lo largo de todos los sitios fueron de 130-180 µg/g dwt en hoja, 26-58 µg/g dwt en raíz, y 39-130 µg/g dwt en la planta completa.

Niveles de expresión
- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

Monsanto ha desarrollado el maíz Roundup Ready evento NK 603 (identificador único MON-ØØ6Ø3-6) que produce la proteína 5-enolpiruvil shikimato-3 fosfato sintasa de

Agrobacterium sp. cepa CP4 (CP4 EPSPS). La proteína CP4 EPSPS proporciona tolerancia a glifosato, el ingrediente activo de los herbicidas agrícolas de la familia Faena.
El objetivo de este estudio fue cuantificar los niveles de la proteína CP4 EPSPS mediante un ensayo inmunoenzimático validado (ELISA) a partir de tejidos provenientes de plantas de maíz crecidas en campos experimentales ubicados en los Estados Unidos. Las muestras de tejido fueron obtenidas de plantas provenientes de 4 evaluaciones de campo en 2002 bajo el Plan de Producción # 02-01-46-26.
Todos los niveles de proteína para todos los tipos de tejido se calcularon en base a microgramos por gramo de peso fresco. El contenido de humedad fue determinado para todos los tipos de tejido y todos los niveles de proteína mayores que el límite de cuantificación del ensayo (LOQ) fueron convertidos a valores de peso seco. El material control para este estudio fue maíz híbrido convencional que proporcionó una matriz de fondo para la cuantificación analítica de los niveles de la proteína CP4 EPSPS en las muestras vegetales. El nivel promedio de la proteína CP4 EPSPS en todos los cuatro sitios para los tejidos foliares de los diferentes estadios de desarrollo (OSL-1, OSL-3, OSL-4, y OSL-5) fueron de 410, 300, 430 y 400 microgramos/gramo de peso seco, respectivamente. El nivel promedio de la proteína CP4 EPSPS en todos los sitios para tejidos de la raíz de los diferentes estadios de desarrollo (OSR-1, OSR-3, OSR-4, y OSR-5) fueron de 160, 76, 100 y 99 microgramos/gramo de peso seco, respectivamente.
El nivel promedio de la proteína CP4 EPSPS en todos los sitios para tejidos provenientes de forraje, raíz, polen y grano fueron de 100, 140, 650 y 14 microgramos/gramo de peso seco, respectivamente.

Ver carpeta de Niveles de expresión

III.C CARACTERÍSTICAS DEL FENOTIPO DEL OGM.

C) CARACTERÍSTICAS DEL FENOTIPO DEL OGM;

Antecedentes sobre características de maleza o invasora en el organismo receptor

El maíz es un cultivo anual que depende de la intervención humana para sobrevivir (Martínez-Soriano y Leal-Klevezas, 2000). Por lo tanto, las plantas de maíz no sobrevivirán naturalmente como maleza y no tienen características de maleza. En contraste, las plantas de teocintle tienen características de maleza (por ejemplo, latencia de la semilla, dispersión de semilla) que han ayudado al teocintle a sobrevivir de forma silvestre por miles de años (Mondrus-Engle, 1981). Morfológicamente el maíz y el teocintle son similares, con flores estaminadas desarrollándose en las espigas y las flores pistiladas desarrollándose en los jilotes axilares. La mazorca del maíz es sólida, mientras que la “mazorca” del teocintle es quebradiza y se separa de la planta al llegar a la madurez para promover la dispersión de las semillas (Eubanks, 2001). Las semillas del teocintle están protegidas por estructuras con alto contenido de celulosa y lignina llamadas fructificaciones. Las fructificaciones están compuestas de segmentos sólidos del raquis de la espiga, y glumas lignificadas externas que promueven la latencia (Mondrus-Engle, 1981). La dispersión y latencia de la semilla, así como el desarrollo de barreras de incompatibilidad genética en el teocintle ssp. *mexicana* son características que han ayudado a que el maíz y el teosinte ssp. *mexicana* hayan coexistido como entidades diferentes por miles de años (Baltazar et al., 2005).

Prácticas agronómicas comúnmente utilizadas compradas con su contraparte convencional.

De acuerdo a las características del fenotipo del OGM, no presentan diferencias en cuanto a las prácticas agronómicas comúnmente utilizadas compradas con su contraparte convencional, estas solo se presentan para las características de control de maleza y control de plagas.

PRÁCTICAS AGRONÓMICAS	**CULTIVO MAÍZ**	
PREPARACIÓN DEL TERRENO		
Subsoleo	Inmediatamente después de la cosecha anterior	
Barbecho	Inmediatamente después del subsoleo	
Rastreo	Inmediatamente después del barbecho	
Nivelación	Después del barbecho	
Época de siembra	Depende de la región (p. ej. 15 de febrero al 15 de julio , Bajío-Norte)	
Método de siembra	Siembra en Seco ó en Húmedo o "a tierra venida"	
DENSIDAD DE SIEMBRA	Controles y Material Biotecnológico, utilizarán una densidad de Siembra de nueve plantas por metro lineal. (Para que queden seis plantas por metro).	
RIEGOS	Sin restricción: Cinco riegos de auxilio a los 40, 70, 95, 115 y 135 días; o bien a los 40, 75, 105, y 130 días posteriores a la siembra. Con restricción media: Cuatro riegos de auxilio, a los 40, 70 y 95 días después de siembra.	
FERTILIZACIÓN	La primera fertilización al momento de la siembra, y la segunda al primer cultivo	
LABORES DE CULTIVO		
*** CONTROL DE MALEZA ***	**Biotecnología**	**Convencional**
	Control de maleza durante el periodo crítico de competencia después de la emergencia del maíz **mediante la aplicación total postemergente del herbicida Faena Fuerte con Transorb® complementado con labores culturales.**	Mantener limpio de maleza el cultivo el periodo crítico de competencia, desde siembra hasta los primeros 40 días después de la emergencia, mediante la aplicación de herbicidas Pre y Postemergentes, complementado con labores culturales, aplicando Postemergentes para malezas de aparición tardía.
*** CONTROL DE PLAGAS***	**Biotecnología**	**Convencional**
***Insectos lepidópteros ***	**Mediante la acción de la tecnología genética MON 89034, expresada en la planta de maíz.**	Aplicación de Insecticidas químico, al llegar al umbral de daño económico de la plaga respectiva.
COSECHA	Cosecha mecánica al llegar debajo de 20% de humedad el grano.	
DESVARE	Inmediatamente después de la Cosecha o al momento de ella.	

Caracterización Agronómica
- MON-89Ø34-3 (MON89034)

Análisis de composición a forraje y grano de maíz colectado de MON 89034 cultivado en evaluaciones de campo en los Estados Unidos durante 2004

Monsanto Company ha desarrollado el maíz evento MON 89034 que produce las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 que confieren protección al daño ocasionado por el barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*) y otras plagas de insectos lepidópteros. Cry1A.105 es

una proteína Cry1A modificada de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Cry2Ab2 es una proteína *B.t.* (subsp. *kurstaki*). La combinación de las proteínas insecticidas Cry2Ab2 y Cry1A.105 en una sola planta proporciona un mejor control de insectos y ofrece una herramienta adicional para el manejo de la resistencia en insectos.
El objetivo de este estudio fue evaluar la composición de MON 89034 comparado con maíz convencional. Los materiales de evaluación, control y referencia empleados en este estudio fueron cultivados en cinco sitios a lo largo de los Estados Unidos durante la temporada de siembra de 2004 bajo el plan de producción 04-01-50-02 (Leafgren, 2005). El material control convencional empleado en este estudio, LH198 x LH172, tiene el fondo genético representativo de los materiales de evaluación, MON 89034, pero no contiene las proteínas Cry1A.105 ni Cry2Ab2.

Se incluyeron quince diferentes materiales de maíz convencional como referencias para proporcionar los datos que permitieron desarrollar un intervalo de tolerancia de 99% para cada compuesto analizado.

Se obtuvieron muestras de forraje y grano de todas las parcelas y fueron analizadas para determinar su composición. Los compuestos analizados fueron seleccionados con base en las recomendaciones especificadas por la OECD (OECD, 2002). Los análisis de composición para las muestras de forraje incluyeron proximales (proteína, grasa, ceniza y humedad), fibra detergente ácido (ADF), fibra detergente neutro (NDF), minerales (calcio y fósforo) y carbohidratos por cálculo. El análisis de composición a muestras de granos incluyeron proximales (proteína, grasa, ceniza y humedad), ADF, NDF, fibra dietética total (TDF), aminoácidos, ácidos grasos (C8-C22), vitaminas (B1, B2, B6, E, niacina y pacido fólico), anti-nutrientes (ácido fítico y rafinosa), metabolitos secundarios (furfural, ácido ferúlico y ácido p-cumárico), minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc) y carbohidratos por cálculo. Un total de 77 diferentes analitos (9 en forraje y 68 en grano) fueron cuantificados. De estos compuestos 16 presentaron más del 50% de las observaciones abajo del LOQ del ensayo y como resultado fueron excluidas del análisis estadístico. Por lo tanto, 61 compuestos fueron evaluados estadísticamente (9 en forraje y 52 en grano). La evaluación estadística de los datos de composición fue realizado empleando un modelo mixto de análisis de varianza en seis conjuntos de datos: análisis de datos de cada una de las 5 pruebas de campo más los datos de la combinación de todos los 5 sitios, referidos como el sitio combinado en este reporte. La evaluación estadística de los datos de composición incluyó una comparación del forraje y grano de MON 89034 con el maíz control convencional. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas para un nivel de significancia del 5% ($p<0.05$). Se realizaron 366 comparaciones estadísticas entre el material de evaluación y el control convencional (61 comparaciones en el sitio combinado y 305 comparaciones en los sitios individuales). Empleando los datos para cada componente obtenido de los 15 materiales convencionales se calculó un intervalo de tolerancia de 99% para contener, con 95% de confianza, el 99% de los valores contenidos en la población de materiales convencionales de maíz. Para aquellas comparaciones en las que el material de evaluación fue significativamente diferente ($p<0.05$) del control, el rango de prueba fue entonces comparado con el intervalo de tolerancia del 99% para determinar si el rango de prueba se encontraba dentro del intervalo de tolerancia y por lo tanto considerado como parte de la población de maíz convencional.

El análisis estadístico de MON 89034 del sitio combinado mostró diferencias estadísticamente significativas para tres analitos. Para dos de estos tres analitos también se presentaron diferencias estadísticamente significativas en más de uno de los sitios individuales. Para el otro analito se presentó diferencia estadística en solamente uno de los sitios individuales. El

análisis estadístico de MON 89034 a partir de los 5 sitios individuales mostró que 11 analitos eran estadísticamente diferentes al control en más de un sitio individual y 33 analitos fueron estadísticamente diferentes del control en solamente un sitio. Todas las medias y el rango de valores de las sustancias evaluadas se encontraron dentro del rango de valores obtenido ya sea del intervalo de tolerancia de 99% y/o los rangos del banco de datos de composición de ILSI (ILSI Crop Composition Database), por lo tanto estas diferencias no se consideraron como biológicamente relevantes.

Caracterización Agronómica
- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

Monsanto Company ha desarrollado el maíz Roundup Ready evento NK 603 que es tolerante a glifosato (el ingrediente activo de los herbicidas agrícolas de la familia Faena) a niveles de aplicación comercial. El maíz evento NK 603 contiene la proteína 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa de Agrobacterium sp. cepa CP4 (CP4 EPSPS). Los maíces que han demostrado un nivel de tolerancia comercial al herbicida Roundup se denominan Roundup Ready (RR, en México Solución Faena). El gen cp4 epsps de Agrobacterium sp. cepa CP4 se ha secuenciado completamente y codifica para una proteína ~ 47.6 kDa que consiste en un péptido sencillo de 455 aminoácidos (Padgette et al., 1995; Padgette et al., 1996). La proteína CP4 EPSPS es funcionalmente similar a las enzimas vegetales EPSPS pero posee una menor afinidad al glifosato (Padgette et al., 1993; Padgette et al., 1995). En las plantas convencionales el glifosato se une a la enzima EPSPS y bloquea la biosíntesis de aminoácidos aromáticos privando de esta manera a las plantas de estos nutrientes esenciales (Steinrucken and Amrhein, 1980; Haslam, 1993). En el maíz evento NK 603, los requerimientos nutricionales para un crecimiento y desarrollo normales se satisfacen por la acción continua de la enzima tolerante a glifosato CP4 EPSPS en la presencia de glifosato. Se ha descrito en la literatura el análisis de inocuidad exhaustivo a la proteína CP4 EPSPS (Harrison et al., 1996; Padgette et al., 1996). La caracterización molecular en detalle del evento NK 603 se incluye en los estudios de Deng et al., 1999.

El propósito del presente estudio fue realizar el análisis de composición en tejidos clave de maíz colectados a partir de maíz transgénico NK 603 evento NK 603 (LH82xNK603+/B73BC2S2), la línea parental convencional (LH82xB73BC2S2) y 19 híbridos comerciales de maíz convencional crecidos bajo condiciones de campo. Las evaluaciones de campo se realizaron en la Unión Europea durante 1999 con repeticiones en cuatro sitios localizados en Germignonville, Francia (Sitio FN-1); Janville, Francia (Sitio FN-2); L'Isle Jourdain, Francia (Sitio FS-3); y Bagnarola, Italia (Sitio IT-4). Se plantaron en todos los sitios el maíz evento NK 603 y su línea control. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar en los sitios FS-3 y en IT-4. Ara los sitios FN-1 y FN-2 las parcelas de NK 603 no se ubicaron en el mismo bloque que las parcelas control de materiales convencionales debido a limitaciones de espacio y por lo tanto se utilizó un diseño de bloque incompleto (tratado/sin tratar) para estos dos sitios. Se colectaron de todos los sitios forraje y grano. Se realizaron análisis de composición cuantificando para grano proximales (proteína, grasa, ceniza, humedad), fibra detergente ácido (ADF), fibra detergente neutro (NDF), aminoácidos, ácidos grasos, vitamina E, minerales (calcio, cobre, fierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc), ácido fítico y contenido de inhibidor de tripsina; y para forraje proximales, ADF, NDF. Además, el contenido de carbohidratos en forraje y granos fue determinado por cálculo. En total, se evaluaron 51 compuestos (7 en forraje y 44 en grano) como parte del análisis de inocuidad y nutricional del maíz evento NK 603.

Se realizaron análisis estadísticos a los datos de composición empleando un modelo analítico de varianza para bloques completos al azar para tres conjuntos de comparaciones: análisis de datos de pruebas replicadas en los sitios FS-3 y IT-4 y los datos de una combinación de ambas pruebas. Como fueron evaluados 51 compuestos, se realizó un total de 153 comparaciones: 51 comparaciones para cada uno de los tres análisis estadísticos. El evento de prueba, NK 603, fue comparado con el híbrido control no transgénico para determinar diferencias estadísticamente significativas a $p<0.05$. Además, la comparación de NK 603 con un intervalo de confianza del 95% para las referencias de híbridos comerciales fue realizada para determinar si el rango de valores de NK 603 se encontraba dentro de la población de maíces comerciales. Debido a que un diseño de bloques completamente al azar no era posible para las réplicas de los sitios FN-1 y FN-2, la estadística descriptiva que incluye medias, errores estándar (S.E.) y el rango de valores fueron determinados para estas evaluaciones.

Los resultados de análisis de composición mostraron que los 51 compuestos cuantificados en el maíz evento NK 603 se encontraban ya sea dentro del rango observado para maíces comerciales plantados en los mismos sitios en la Unión Europea en 1999, se encontraban dentro de los rangos publicados en la (Jugenheimer, 1976; Watson,1982; Watson, 1987), o se encontraban dentro de los rangos históricos de variedades de maíz convencionales (Sanders and Patzer, 1995; Sanders et al., 1996a,b; 1997 a,b,c). No se presentaron diferencias estadísticas significativas en 126 de las 153 comparaciones realizadas entre el maíz evento NK 603 y la línea control no transgénica que incluyó los niveles de compuestos para forraje (humedad, grasa, proteína, ceniza, carbohidratos, ADF y NDF) y compuestos del grano (ceniza, humedad, ADF, NDF, siete de los 18 aminoácidos, dos de los ocho ácidos grasos, cinco de los ocho minerales, vitamina E y el inhibidor de tripsina). Las medias y errores estándar de los sitios FN-1 y FN-2 con un diseño de bloque incompleto (tratado/sin tratar) fueron consistentes con lo obtenido en los sitios FS-3 y IT-4.

De las 27 comparaciones que se encontraron ser estadísticamente diferentes, el 5% o aproximadamente ocho (0.05 x 153) se esperaban ser falsos positivos basados simplemente en la probabilidad. Las diferencias observadas únicamente en una de las dos comparaciones y que no eran consistentes a lo largo de las tres comparaciones es improbable que sean de significancia biológica. Las diferencias entre el evento de prueba y la línea control expresado como porcentaje de los valores control se ubicaron entre el 1.13% y el 22.93%. Además, el rango de valores para estos compuestos de composición asociados con las pequeñas diferencias estadísticas se encontró que se ubicaban dentro del intervalo de tolerancia de 95% para variedades comerciales cultivadas en los mismos sitios de la Unión Europea en 1999. Esto demuestra, con un intervalo de confianza del 95%, que los niveles de compuestos clave y otros constituyentes bioquímicos del NK 603 se ubicaron dentro de la misma población tal como se esperaba para el maíz comercial no transgénico empleado como referencia en este estudio. Por lo tanto, estas pequeñas diferencias es improbable que sean biológicamente significativas y se considera que el forraje y grano de NK 603 es equivalente en composición al grano y forraje de maíz convencional.
Estos datos apoyan la conclusión de que el maíz Roundup Ready evento NK 603 es equivalente en composición y tan seguro y nutritivo como las variedades de maíz cultivadas comercialmente en la actualidad.
(Ver carpeta de composición)

Análisis de Impacto Potencial Acumulativo del MON 89034 en Productos con combinación de características (Stacks) Resultantes de Cruzamiento Convencional con otros Productos derivados de la Biotecnología

Mediante cruzamiento convencional se han realizado combinaciones que permiten obtener diferentes productos de maíz biotecnológico con transgenes apilados que satisfacen una más amplia gama de necesidades de los productores. Por ejemplo, se han combinado mediante cruzamiento convencional características que confieren resistencia a insectos con características de tolerancia a herbicidas, y características que confieren resistencia frente a insectos lepidópteros han sido combinadas mediante cruzamiento convencional con características que confieren resistentes a coleópteros para obtener productos que poseen una combinación de características en una sola planta.

En la actualidad más de 20 productos de maíz derivados de la biotecnología han completado el proceso regulatorio en los Estados Unidos bajo la supervisión regulatoria de la EPA, la FDA y el USDA (EPA, 2007; FDA, 2007; USDA, 2007). Se han desarrollado tres principales tipos de maíces biotecnológicos que se han adoptado ampliamente en los Estados Unidos por los productores de maíz, quienes cada vez más seleccionan plantas con productos apilados. Estos tres principales tipos de maíces biotecnológicos incluyen: 1) maíces protegidos frente a lepidópteros, 2) maíces protegidos frente a coleópteros, y 3) maíces tolerantes a herbicida incluyendo las características de resistencia a glifosato y tolerancia a glufosinato. Además, otra característica como maíz de alto contenido de lisina se ha desarrollado y aprobado en los Estados Unidos.

Diferentes productos con combinación de características se han producido a partir de los eventos individuales aprobados y desregulados mediante cruzamiento convencional y se han cultivado por los productores de los Estados Unidos. Una encuesta realizada por el Servicio Nacional de Estadística Agropecuaria (National Agricultural Statistics Service) mostró que el 61% de la superficie que en 2006 se dedicó a maíz se cultivó con materiales derivados de la biotecnología (USDA-NASS, 2006). Los porcentajes de maíz protegido frente al ataque de insectos, maíz tolerante a herbicida y el producto con combinación de genes, fueron de 25%, 21% y 15%, respectivamente. Se debe hacer notar que en esta encuesta el “maíz protegido frente a insectos” incluye tanto eventos individuales como con genes apilados frente al ataque de insectos.

Los productos derivados de la biotecnología con combinación de características o productos de la combinación de eventos mediante cruzamiento convencional a partir de eventos aprobados deben ser sujetos al mismo seguimiento regulatorio que se aplica a las variedades convencionales de cultivos que se producen por mejoramiento convencional. Los análisis de seguridad realizados a los eventos individuales son suficientes para cubrir cualquier combinación de eventos que se pueda tener para eventos no relacionados. Las variedades de cultivos producidas mediante cruzamiento convencional han demostrado un largo historial de seguridad. Para los productos derivados de la biotecnología una vez que se analizan los eventos individales y que se determina que son seguros para el consumo humano y animal y para el ambiente, entonces al combinar eventos individuales no realcionados mediante cruzamiento convencional no deben poseer ninguna característica nueva que pudiese cambiar las conclusiones sobre su inocuidad. Cualquier análisis realizado para productos con una sola característica pueden ser empleados como base para cualquier combinación potencial basado en el tipo de genes, la localización de las proteínas u otros ingredientes activos y los modos de acción de las características. Los mejoradores han desarrollado procedimientos estándar para evaluación y análisis para examinar y confirmar la equivalencia de los productos con combinación de características con los productos de eventos individuales en fenotipos, características agronómicos y la eficacia de las características. En el caso de combinación de características estrechamente relacionadas, por ejemplo dos o más proteínas Bt, se debe analizar cualquier potencial de efecto acumulativo en base caso por caso. No se han

reportado efectos acumulativos para todos los productos con combinación de características registrados de maíz Bt o algodón (EPA, 2007).

El MON 89034 puede ser combinado con los eventos de maíz existentes que han sido aprobados y desregulados incluyendo la característica de protección a gusano de la raíz, tolerancia a herbicida o con incremento en lisina, mediante cruzamiento convencional. No se espera que los productos con combinación de características interactúen a niveles molecular o de proteínas basados en sus modos de acción bien caracterizados. Los análisis de cualquier producto de maíz existente en el comercio y sobre MON 89034 aplica para los productos con combinación de características potenciales. No se esperan nuevos impactos acumulados para estas combinaciones.

Referencias

1. EPA. 2007. Current & Previously Registered Section 3 PIP Registrations. http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/pip_list.htm
2. FDA. 2007. List of Completed Consultations on Bioengineered Foods. http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/biocon.html.
3. USDA. 2007. Petitions of Nonregulated Status Granted or Pending by APHIS. http://www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html
4. USDA-NASS. 2006. National Agricultural Statistics Service, United States Department of Agriculture. Acreage Report, Cr Pr2-5 (6-06) a. June 30, 2006. http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/nass/Acre/2000s/2006/Acre-06-30-2006.pdf

III.D IDENTIFICACIÓN DE CUALQUIER CARACTERÍSTICA FÍSICA Y FENOTÍPICA NUEVA RELACINADA CON EL OGM QUE PUEDA TENER EFECTOS ADVERSOS SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y EL MEDIO AMBIENTE RECEPTOR DEL OGM.

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;

Efectos en Organismos no Blanco.

- MON-89Ø34-3 (MON89034)

Para investigar su espectro insecticida, la proteína Cry1A.105 fue adicionada a dietas artificiales para evaluar su efecto en 15 diferentes clases de insectos incluyendo 5 especies de insectos del orden Lepidóptera. Como resultado de la evaluación se tiene que la proteína Cry1A.105 exhibió actividad insecticida contra larvas de gusano elotero (CEW; *Helicoverpa zea*), trozador (BCW; *Agrotis epsilon*), cogollero (FAW; *Spodoptera frugiperda*), barrenador del suroeste (SWCB; *Diatraea grandiosella*), y del barrenador europeo del maíz (ECB; *Ostrinia nubilalis*), principales insectos plaga del maíz, aunque no se presentó ninguna actividad insecticida contra abejas, catarinitas ni otros insectos benéficos (Tabla 6).
Con base en los resultados anteriores fue confirmado que la proteína Cry1A.105 exhibe una actividad insecticida selectiva solamente contra insectos del orden Lepidóptera y que no posee actividad insecticida contra otras especies de insectos.

Tabla 6. Espectro insecticida de la proteína Cry1A.105.

Orden	Familia	Nombre Científico	Etapa de desarrollo	LC_{50}(µg/mL ó g por dieta)[a]
Lepidóptera	Noctuidae	*Helicoverpa zea*	Larva	15
		Agrotis ipsilon	Larva	33
		Spodoptera frugiperda	Larva	6.9
	Crambidae	*Diatraea grandiosella*	Larva	37
		Ostrinia nubilalis	Larva	0.43
Collembola	Isotomidae	*Folsomia candida*	Adulto joven	>80[b]
Coleoptera	Curculinoidae	*Anthonomus grandis grandis*	Larva	>100
	Chrysomelidae	*Diabrotica unecimpunctata howardi*	Larva	>100
	Coccinellidae	*Coleomegilla maculata*	Larva	>240
Hymenoptera	Ichneumonidae	*Ichneumon promissorius*)	Adulto	>240
	Apidae	*Apis mellifera*	Adulto	>550
		Apis mellifera	Larva	>11 µg/célula
Hemiptera Sub-orden: Homoptera	Aphididae	*Myzus persiscae*	Adulto /Adulto joven	>80
Hemiptera Sub-orden: Heteroptera	Miridae	*Lygus hesperus*	Adulto joven	>80
	Anthocoridae	*Orius insidiosus*	Adulto joven	>240

a Los valores con el signo ">" hacen referencia a la mayor densidad entre las muestras utilizadas en las pruebas.
b Las pruebas se llevaron a cabo utilizando hojas liofilizadas de este maíz recombinante.

Para investigar su espectro insecticida, la proteína **Cry2Ab** fue adicionada a dietas artificiales para evaluar su efecto en 15 diferentes clases de insectos incluyendo 4 especies de insectos del orden Lepidóptera. Como resultado de la evaluación se tiene que la proteína Cry2Ab2 exhibió actividad insecticida contra larvas de gusano elotero (CEW; *Helicoverpa zea*), gusano cogollero (FAW; *Spodoptera frugiperda*) y del barrenador europeo del maíz (ECB; *Ostrinia nubilalis*), pero no contra el gusano trozador (BCW; *Agrosis epsilon*). También se tiene que la proteína Cry2Ab2 no presentó ninguna actividad insecticida contra abejas, catarinitas ni otros insectos benéficos (Tabla 7); por lo tanto se confirmó que la proteína Cry2Ab ofrece una actividad insecticida específica solamente contra insectos del orden Lepidóptera y no contra otras especies de insectos.

Tabla 7. Espectro insecticida de la proteína modificada Cry2Ab.

Orden	Familia	Nombre Científico	Etapa de desarrollo	LC_{50}(µg/mL ó g por dieta)[a]
Lepidoptera	Noctuidae	*Helicoverpa zea*	Larva	9.9
		Agrotis ipsilon	Larva	>100[b]
		Spodoptera frugiperda	Larva	<50[c]
	Crambidae	*Ostrinia nubilalis*	Larva	1.5
Collembola	Isotomidae	*Folsomia candida*	Adulto joven	>70[d]
Coleoptera	Curculinoidae	*Anthonomus grandis grandis*	Larva	>100
	Chrysomelidae	*Diabrotica unecimpunctata howardi*	Larva	>100
	Coccinellidae	*Coleomegilla maculata*	Larva	>120
Hymenoptera	Ichneumonidae	*Ichneumon promissorius*	Adulto	>100
		Nasonia vetripennis	Adulto	>4500
	Apidae	*Apis mellifera*	Adulto	>68
		Apis mellifera	Larva	>0.6 µg/célula
Hemiptera Sub-orden: Homoptera	Aphididae	*Myzus persiscae*	Adulto /Adulto joven	>80
Hemiptera Sub-orden: Heteroptera	Miridae	*Lygus hesperus*	Adulto joven	>80
	Anthocoridae	*Orius insidiosus*	Adulto joven	>100

a Los valores con el signo ">" hacen referencia a la mayor densidad entre las muestras utilizadas en las pruebas. Los valores con el signo "<" hacen referencia a la menor densidad entre las muestras utilizadas en las pruebas.
b El índice de mortalidad fue del 42% cuando se administró la dosis máxima de 100 µg/mL.
c El índice de mortalidad fue del 61% cuando se administró la dosis mínima de 50 µg/mL.
d Las pruebas se llevaron a cabo utilizando hojas liofilizadas de este maíz recombinante.

[gen *cry1A.105* + gen *cry2Ab*]

Como resultado de las pruebas de este maíz recombinante para resistencia a las principales plagas de insectos del orden Lepidóptera (barrenadores, gusano cogollero, gusano elotero) realizadas de 2003 a 2004 en los Estados Unidos, Puerto Rico y Argentina, se confirmó que este maíz recombinante exhibe resistencia frente a todos los insectos Lepidópteros evaluados. Además, como resultado de la comparación con MON 810, la primera generación de maíz resistente a insectos, se confirmó que este maíz recombinante ofrece una mayor resistencia al cogollero y al elotero que ocasionan daño muy fuerte al maíz de zonas templadas.

Con la expresión simultánea de dos proteínas que ofrecen un espectro insecticida que se sobrelapa en cierta medida, los insectos blanco, que presentan susceptibilidad a este maíz recombinante, podrían no adquirir resistencia hasta que presenten susceptibilidad a las dos clases de proteínas Bt. Esto genera expectativas de que este maíz recombinante pudiera ser capaz de reducir substancialmente la posibilidad de resistencia comparado con maíces Bt que expresan solamente una clase de proteína Bt.

Se ha demostrado que la proteína Cry1A.105 y la proteína Cry2Ab2 no presentan ninguna actividad insecticida sinergística contra los insectos blanco del orden Lepidoptera que muestran

susceptibilidad a ambas proteínas Bt. Además, aunque “micotoxina” se refiere a toxinas fúngicas que incluyen a la Aflatoxina y la Ocratoxina A, que son conocidas como carcinógenos y se presentan en partes dañadas por insectos lepidópteros, se espera que este maíz recombinante pueda permitir una reducción en la ocurrencia de micotoxinas debido a la resistencia frente a lepidópteros y a un incremento en la seguridad del uso del maíz como alimento y pienso.
(Ver carpeta de Organismos no blanco.)

III.E COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN FENOTÍPICA DEL OGM RESPECTO AL ORGANISMO RECEPTOR, LA CUAL INCLUYA, CICLO BIOLÓGICO Y CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA BÁSICA.

E) COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN FENOTÍPICA DEL OGM RESPECTO AL ORGANISMO RECEPTOR, LA CUAL INCLUYA AL MENOS, CICLO BIOLÓGICO Y CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA BÁSICA;

Ver inciso C.

III.F DECLARACIÓN SOBRE LA EXISTENCIA DE EFECTOS SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y AL MEDIO AMBIENTE QUE PUEDAN DERIVAR DE LA LIBERACIÓN DEL OGM.

El experimento de liberación al ambiente para el organismo genéticamente modificado MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6, será un experimento contenido y ejecutado bajo condiciones estrictas de bioseguridad que permitan su implementación y manejo seguro.

El maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6, integra características para control de larvas de insectos lepidópteros blanco y de maleza substituyendo las opciones convencionales con potenciales beneficios en cuanto a disminución en la cantidad la cantidad de plaguicidas (insecticidas y herbicidas) que se requerirían para la protección del maíz y consecuentemente disminuyendo el impacto ambiental asociado.

Las características fenotípicas y agronómicas del evento MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 en maíz han sido evaluadas en el país de origen mediante comparación a controles apropiados para determinar su potencial de plaga e impacto potencial al ambiente. Estas evaluaciones incluyeron parámetros sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, germinación de semilla y observaciones para cada una de interacciones planta-insectos, planta-enfermedades y respuesta de la planta a condiciones estresantes del ambiente. Los resultados de las evaluaciones fenotípicas y agronómicas indican que el evento MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 en maíz no presentan características que pudiesen conferir a la planta de maíz el riesgo de ser plaga o de incrementar su riesgo ecológico en comparación al maíz convencional. Los datos sobre interacciones ecológicas indican que el evento MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 en maíz no confieren ningún incremento en susceptibilidad o tolerancia a enfermedades específicas, insectos (a excepción de los insectos blanco de la tecnología MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6), o estresantes abióticos. Los datos de los estudios de composición demostraron la equivalencia en composición en niveles nutricionales así como de compuestos anti nutricionales y metabolitos secundarios entre el forraje y grano del maíz con el evento MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 y el maíz convencional. Estos datos en su conjunto soportan la conclusión de que el evento MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 en maíz es improbable que

posea un incremento en el potencial como plaga o que resulte en algún impacto negativo al ambiente en comparación al maíz convencional.

III.G DESCRIPCIÓN DE UNO O MÁS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN, NIVELES DE SENSIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

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;

La información específica sobre los métodos de detección se presenta a la SAGARPA-SEMARNAT como parte de esta solicitud (**Ver Carpeta de Métodos de Detección**)

III.H EXISTENCIA POTENCIAL DE FLUJO GÉNICO DEL OGM A ESPECIES RELACIONADAS.

H) EXISTENCIA POTENCIAL DE FLUJO GÉNICO DEL OGM A ESPECIES RELACIONADAS;

DINÁMICA DE POLINIZACIÓN EN EL GÉNERO ZEA

El teocintle y el maíz son especies de polinización anemófila, por lo tanto, los niveles de entrecruzamiento están estrechamente relacionados a la biología de las inflorescencias femenina y masculina. Una espiga individual de maíz hibrido de tamaño normal puede producir hasta 25 millones de granos de polen (Kiesselbach, 1999). El teocintle tiene un mayor número de espigas y un número menor de granos de polen en comparación al maíz, por lo tanto en base a planta, es un mayor productor de polen que el maíz (Baltazar et al., 2005; Aylor et al., 2005). La dispersión del polen del maíz está determinada por una diversidad de factores ambientales y físicos. La dirección, turbulencia y velocidad del viento están directamente relacionadas con el movimiento del polen (James and Brooks, 1950; Di-Giovanni and Kevan, 1991; Di-Giovanni et al., 1995). De igual manera, otros factores como la densidad del polen, densidad y viscosidad del aire, velocidad de sedimentación y radio del polen, parecen influenciar su transporte y su deposición (Di-Giovanni et al., 1995). Una vez en la atmósfera, los granos de polen se deben mantener viables el tiempo suficiente para llevar a cabo el proceso de polinización (Luna et al., 2001).

Los estigmas emergen típicamente del jilote de uno a tres días después de que inicia la liberación de polen. Una mazorca de maíz híbrido puede producir hasta un promedio de 1000 estigmas (Kiesselbach, 1999). En la ausencia de fertilización y bajo condiciones normales de riego, la elongación de los estigmas del maíz continúa por aproximadamente 7 a 10 días antes de que comiencen a fenecer (Basseti y Destrate, 1993a; Basseti y Destrate, 1993b). Patrones similares de elongación de los estigmas han sido observados en experimentos realizados en México con razas locales, híbridos de regiones templadas y teocintles (Baltazar y Schoper, 2001). Sin embargo, los estigmas de las razas locales manifestaron una tendencia a detener la elongación después de 10 días y los estigmas de los teocintles a los 3 – 4 días después de emergidos del jilote. Típicamente, los estigmas proveen al grano de polen de humedad y otros nutrientes, lo que provoca su geminación. El crecimiento del tubo polínico es visible por lo

regular a los 30 minutos de que el grano de polen haya llegado a un estigma receptivo y la fertilización suele ocurrir dentro de aproximadamente 24 horas (Kiesselbach, 1999).

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

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

Existe información limitada con respecto a la viabilidad y capacidad de reemplazo de los híbridos de maíz x teocintle entre el maíz cultivado y el teocintle ssp. *mexicana.* Esto puede deberse a la dificultad de producir híbridos en cruzas recíprocas (Evans y Kermicle, 2001; Baltazar et al., 2005). Sin embargo, un estudio de campo con híbridos entre maíz tolerante al glifosato y teocintle de Chalco indicó que híbridos entre el maíz y el teocintle (ssp. *parviglumis*) tenían un mayor vigor y produjeron más semillas que el padre silvestre (Guadagnuolo, et al. 2006). Sin embargo, los autores reportaron que en la ausencia de presión selectiva del herbicida glifosato, no se observó ningún impacto positivo o negativo del transgén en el estado físico o el vigor de la progenie del híbrido o el maíz puro.

III.I BIBLIOGRAFÍA RECIENTE DE REFERENCIA A LOS DATOS PRESENTADOS

I) BIBLIOGRAFÍA RECIENTE DE REFERENCIA A LOS DATOS PRESENTADOS, Y

En cumplimiento al Titulo Segundo, Capitulo 1, Articulo 6 del Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, la presente solicitud, así como los documentos que de conformidad con el Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente modificados son necesarios para que las autoridades competentes lleven a cabo el correspondiente análisis de riesgo, se presentan en idioma español.

De igual manera, como información adicional de soporte no obligatoria, acompañamos soporte bibliográfico privado de documentos confidenciales que son propiedad de Monsanto, en el idioma inglés, los cuales, no forman parte de la solicitud, ya que son solamente referencias para coadyuvar con esa H, Dependencia en el otorgamiento de los solicitados permisos. Dichos documentos se encuentran marcados bajo la leyenda “INFORMACIÓN CONFIDENCIAL PROPIEDAD DE: MONSANTO COMERCIAL, S.A. DE C.V.”, es decir confidenciales, de conformidad con los artículos 70 y 71 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, por lo que su consulta y divulgación debe mantenerse de conformidad con las disposiciones antes mencionadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cervantes M.J.E. 1998. Infiltración genética entre variedades locales e introducidas de maíz de sistema tradicional de Cuzalapa, Jalisco. PhD thesis, Colegio de Postgraduados, Montecillo-Texcoco, Edo. de México, México

CIMMYT http://www.cimmyt.org/

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S-B., Hoffmann, N-L., Woo, S.C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc Nat Acad Sci U.S.A., 80(15), 4803-07.

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

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

Gill, S.S., E.A. Cowles, and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of Bacillus thuringiensis endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37:615-636.

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

Harrison, L.A., Bailey, M.R., Leimgruber, R.M., Smith, C.E., Nida, D.L., Taylor, M.L., and Padgette, S.R. 1993. Equivalence of plant-and microbially-expressed proteins: CP4 EPSPS from glyphosate-tolerant soybeans and E. coli. MSL-12899, an unpublished study conducted by Monsanto.

Harrison, L., Bailey, M., Naylor, M., Ream, J., Hammond, B., Nida, D., Burnette, B., Nickson, T., Mitsky, T., Talor, M., Fuchs, R., and Padgette, S. (1996). The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolypyryvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. J. Nutr. 126: 728-740.
Iltis and Benz (2000, Novon 10: 382-390)

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

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

Kato Y.T.A. 1997. Review of introgression between maize and teosinte. In: Serratos JA, Willcox MC, Castillo F (eds) ProcForum: gene flow among maize landraces, improved maize varieties, and teosinte: implications for transgenic maize. CIMMYT, Mexico City, pp 44–53

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

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

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

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

Klee, H.J. and S.G. Rogers. 1987. Cloning of an Arabidopsis Gene Encoding 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate Synthase: Sequence Analysis and Manipulation to Obtain Glyphosate-Tolerant Plants. Mol. Gen. Genet. 210:437-442.

Leafgren, R. 2005. Field Production of Corn Tissues from MON 89034 and MON 89597, and their respective traditional crosses with MON 88017 (coleopteran protected, glyphosate tolerant) grown in the United States during 2004. Monsanto Technical Report MSL-19690. St. Louis, MO.

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

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

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

Marzabadi, M.R., Gruys, K.J., Pansegrau, P.D., Walker, M.C., Yuen, H.K., Sikorski, J.A.: 1996. An EPSP synthase inhibitor joining shikimate 3-phosphate with glyphosate: synthesis and ligand binding studies.- Biochemistry 35: 4199–4210

McElroy, D., Zhang, W., Cao, J. and Wu, R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. Plant Cell. 2, 163-171.

Matsuoka, M., Y. Kano-Murakami, Y. Tanaka, Y. Ozeki, and N. Yamamoto. 1987.Nucleotide sequence of the cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5bisphosphate carboxylase from maize. J. Biochem. 102:673-676.

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

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

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

OECD. (2007) Consensus document on safety information on transgenic plants expressing Bacillus thuringiensis-drived insect control proteins, No. 42. Sereies on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology.

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

Padgette, S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. LaVallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor, and G.M. Kishore. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate

Padgette, S.R., Barry, G.F., Re, D.B., Eichholtz, D.A., Weldon, M., Kolacz, K., and Kishore, G.M. (1993). Purification, cloning and characterisation of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp.strain CP4. Report No. MSL-12738, Monsanto Company, USA.

Padgette, S., RE, D., Barry, G., Eichhohz, D., Delannay, X., Fuchs, R., Kishore, G., and Fraley, R. 1996. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup ReadyTM gene, p. 53

Piperno, D. R. Flannery, K. V. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 2101 (2001)

Pope K. O. et al., Science 292, (2001).

Purseglove, J.W. (1972). Tropical Crops: Monocotyledons 1. Longman Group Limited., London.

Raynor, G.S., Ogden, E.C. & Hayes, J.V. (1972). Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. Agronomy Journal 64, 420-427.

Rice, J. F., B. J. Wolff., J. R. Groat, N. K. Scanlon, J. C. Jennings, and J. D. Masucci. 2006. Molecular Analysis of Corn MON 89034. Monsanto Technical Report MSL-20072, St. Louis, MO.

Schnepf, E.; N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, and D.H. Dean. 1998. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

Smith, PNAS 2001 vol. 98 no. 1324-1326.

Sanders, P.R. and Patzer, S.S. (1995). Compositional Analyses of MON 801 Grain and Silage from the 1993 and 1994 Maize Field Trials. Technical Report MSL-14180, Monsanto Company, St. Louis, MO.

Sanders, P.R., Henning, D.M., and Groth, M.E. (1996a). Compositional Analysis of Insect-Protected and Insect-Protected Roundup Ready TM Maize Lines from the 1994 U.S. Field Trials. Technical Report MSL-14326, Monsanto Company, St. Louis, MO.

Sanders, P.R., Groth, M.E., Ledesma, B.E. and Kania, J.R. (1996b). Evaluation of Insect Protected, Insect Protected Roundup ReadyTM, and Roundup Ready'" Maize Lines in the 1995 European Field Trial 95-BTRR-01. Technical Report MSL- 14615, Monsanto Company, St. Louis, MO.

Sanders, P.R., Groth, M.E. and Ledesma, B. E. (1997a). Evaluation of Insect Protected Roundup ReadyTM and Roundup ReadyTM Maize Lines in the 1995 European Field Trial 95-BTRR-02. Technical Report MSL-14383, St. Louis, MO.

Sanders, P.R., Groth, M.E. and Ledesma, B.E. (1997b). Expression and Compositional Analyses of Roundup Ready TM Maize Lines MON 830, MON 831 and MON 832 in the 1995 U.S. Field Trial Following Treatment with Roundup@ Herbicide. Technical Report MSL-15015, Monsanto Company, St. Louis, MO.

Sanders, P.R., Groth, M.E., Ledesma, B.E. and Kania, J.R. (1997c). Expression and Compositional Analyses of Roundup Ready'" Corn Lines MON 830, MON 831 and MON 832 in the 1995 U.S. Field Trials. Technical Report MSL-14724, Monsanto Company, St. Louis, MO.

Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E. & Matilla, H.R. (2000). Ecological impact of Bt corn pollen on Monarch butterfly in Ontario. Canadian Food Inspection Agency (http://www.cfia-acia.agr.ca/english/plaveg/pbo/btmone.shtml)

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

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

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

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

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

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

WHO (World Health Organization). 1999. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 217: *Bacillus thurigiensis*. Geneva.

Zhuang, M. and S.S. Gill, S. S. 2003. Mode of action of Bacillus thuringiensis toxins. Pages 213-236 in Chemistry of Crop Protection, Progress and Prospects in Science and Regulation. Voss, G. and Ramos, G. (ed), Wiley-VCH, Weinheim.

IV MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD Y DE BIOSEGURIDAD.

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

Se anexa el Protocolo de Bioseguridad, cuyo objetivo principal es el de proveer los lineamientos de las mejores prácticas y recomendaciones generales para el transporte, manejo, evaluación y disposición de materiales Genéticamente Modificados (GM), ver carpeta de Bioseguridad.

IV.A MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD

IV.A.1 PLAN DE MONITOREO DETALLADO.

A) MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD:

1. PLAN DE MONITOREO DETALLADO;

La descripción del procedimiento y las medidas de bioseguridad que se utilizarán durante la experimentación se encuentran referidas en el protocolo de "Lineamientos para buenas prácticas de experimentación para evaluar la bioseguridad con maíces genéticamente modificados (GM)", que se encuentra en la carpeta de Bioseguridad.

Cubre aspectos importantes como son:

- TRANSPORTE
- ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO
- COSECHA
- POST COSECHA

ENFOQUE PARA EL MANEJO DEL RIESGO EN LIBERACIONES DE CAMPO EXPERIMENTALES

1. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL EXPERIMENTAL MODIFICADO POR INGENIERÍA GENÉTICA
1.1. INTRODUCCIÓN
1.2. PERSONAL
1.3. TRANSPORTE DE MATERIAL VEGETAL EXPERIMENTAL MODIFICADO POR INGENIERÍA GENÉTICA
1.3.1. Disposición final del material vegetal experimental modificado por ingeniería genética
1.3.2. Registros e informes
1.4. ALMACENAMIENTO DE MATERIALES VEGETALES EXPERIMENTALES MODIFICADOS POR INGENIERÍA GENÉTICA
1.4.1. Disposición final de vegetales modificados genéticamente
1.4.2. Registros e informes

1.5. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE LIBERACIÓN ACCIDENTAL

2. MANEJO DEL LUGAR DEL ENSAYO.
2.1. INTRODUCCIÓN
2.2. PERSONAL
2.3. SIEMBRA DEL ENSAYO
2.3.1. Selección del lugar del ensayo
2.3.2. Demarcación del lugar del ensayo
2.3.3. Mapa del lugar del ensayo
2.3.4. Limpieza del equipo de campo
2.4. AISLAMIENTO REPRODUCTIVO DE LOS ENSAYOS
2.4.1. Biología reproductiva de la especie en experimentación
2.4.2. Aislamiento espacial
2.4.3. Aislamiento temporal
2.4.4. Bordo
2.5. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL
2.6. REGISTROS E INFORMES

3. COSECHA Y DISPOSICIÓN FINAL DE MATERIALES DE ENSAYOS DE CAMPO CONFINADOS
3.2. RETENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL COSECHADO DE LOS ENSAYOS DE CAMPO EXPERIMENTALES
3.3. LIMPIEZA DEL EQUIPO
3.4. FINALIZACIÓN ANTICIPADA DE LOS ENSAYOS
3.5. DISPOSICIÓN FINAL DE MATERIAL VEGETAL DEL ENSAYO
3.6. TRANSPORTE DE MATERIALES COSECHADOS DESDE EL SITIO DEL ENSAYO
3.7. MONITOREO DE LA COSECHA DEL ENSAYO
3.8. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL
3.9. REGISTROS E INFORMES

4. MANEJO DEL LUGAR DEL ENSAYO DESPUÉS DE LA COSECHA
4.1. INTRODUCCIÓN
4.2. RESTRICCIONES POST COSECHA
4.3 MONITOREO POSTCOSECHA DEL LUGAR DEL ENSAYO
4.4. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL
4.5. REGISTROS E INFORMES

IV.A.2 ESTRATEGIAS DE MONITOREO POSTERIORES A LA LIBERACIÓN

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

Ver apartado A-1

IV.A.3 ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DEL OGM Y SU PRESENCIA POSTERIOR EN LA ZONA DE LA LIBERACIÓN Y ZONAS VECINAS, UNA VEZ CONCLUIDA LA LIBERACIÓN.

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.

Ver apartado A-1

IV.B MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE BIOSEGURIDAD.

IV.B.1 MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS PARA PREVENIR LA LIBERAR Y DISPERSIÓN DEL OGM FUERA DE LA ZONA O ZONAS DONDE SE PRETENDE REALIZAR LA LIBERACIÓN.

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;

Ver apartado A-1

IV.B.2 MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS PARA DISMINUIR EL ACCESO DE ORGANISMOS VECTORES DE DISPERSIÓN, O DE PERSONAS QUE NO SE ENCUENTRES AUTORIZADAS PARA INGRESAR AL ÁREA DE LIBERACIÓN A DICHA ZONA O ZONAS.

2. MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS PARA DISMINUIR EL ACCESO DE ORGANISMOS VECTORES DE DISPERSIÓN, O DE PERSONAS QUE NO SE ENCUENTREN AUTORIZADAS PARA INGRESAR AL ÁREA DE LIBERACIÓN A DICHA ZONA O ZONAS;

Ver apartado A-1

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

3. MEDIDAS PARA LA ERRADICACIÓN DEL OGM EN ZONAS DISTINTAS A LAS PERMITIDAS;
Ver apartado A-1

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

4. MEDIDAS PARA EL AISLAMIENTO DE LA ZONA DONDE SE PRETENDA LIBERAR EXPERIMENTALMENTE EL OGM;

Ver apartado A-1

IV.B.5 MEDIDAS PARA LA PROTECCIÓN DE LA SALUD HUMANA Y DEL AMBIENTE, EN CASO DE QUE OCURRIERA UN EVENTO DE LIBERACIÓN NO DESEADO.

5. MEDIDAS PARA LA PROTECCIÓN DE LA SALUD HUMANA Y DEL AMBIENTE, EN CASO DE QUE OCURRIERA UN EVENTO DE LIBERACIÓN NO DESEADO, Y

Ver apartado A-1

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

6. MÉTODOS DE LIMPIEZA O DISPOSICIÓN FINAL DE LOS RESIDUOS DE LA LIBERACIÓN.
EL PROMOVENTE DEBERÁ DISTINGUIR CLARAMENTE LAS MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS QUE SE REALIZARÁN DURANTE LA LIBERACIÓN DE LOS QUE SE REALIZARÁN CON POSTERIORIDAD A LA MISMA.

Ver apartado A-1

V. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROVOMENTE.

V. ANTECEDENTES DE LIBERACIÓN DEL OGM EN OTROS PAÍSES, CUANDO ESTO SE HAYA REALIZADO, DEBIENDO ANEXAR LA INFORMACIÓN PERTINENTE CUANDO ÉSTA SE ENCUENTRE AL ALCANCE DEL PROMOVENTE:

Ver tabla 8 y 9 de autorizaciones Regulatorias.

- MON-89Ø34-3 (MON89034)

Tabla 8. Resumen de Autorizaciones Regulatorias

País	Medio Ambiente	Aprobación como alimento para humanos y /o como alimento para animales (Pienso)	Aprobación como alimento para humanos	Aprobación como alimento para animales (Pienso)
Canadá	2008			2008
Colombia	2008		2008	2007
Japón	2008		2007	2008
Estados Unidos	2008	2007		

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

- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

Tabla 9. Resumen de Autorizaciones Regulatorias

País	Medio Ambiente	Aprobación como alimento para humanos y /o como alimento para animales (Pienso)	Aprobación como alimento para humanos	Aprobación como alimento para animales (Pienso)
Argentina	2004	2004		
Australia / Nueva Zelanda			2002	
Canadá	2001		2001	2001
China		2005		
Colombia	2005		2004	2006
Unión Europea			2004	2004
Hounduras				
Japón	2001		2001	2001
Korea			2002	2004
México		2002		
Filipinas	2005			2003
Federación Rusa	2003 (por 5 años)		2002 (por 5 años)	2008
Singapur				
Sudáfrica	2002	2002		

Taiwan			2003	
Estados Unidos	2000	2000		

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

V.A DESCRIPCIÓN DE LA ZONA EN DONDE SE REALIZÓ LA LIBERACIÓN

V.B EFECTOS DE LA LIBERACIÓN SOBRE LA FLORA Y FAUNA

V.C ESTUDIO DE LOS POSIBLES RIESGOS DE LA LIBERACIÓN DE LOS OGMS PRESENTADO EN EL PAÍS DE ORIGEN (DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS Y PROCEDIMIENTOS DE MONITOREO DE BIOSEGURIDAD)

El análisis de riesgo ambiental del/de los evento MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 incluyó evaluaciones sobre su efecto en características de germinación y dormancia, crecimiento vegetativo, crecimiento reproductivo e interacciones de la planta con insectos, enfermedades y factores de estrés abióticos.

Las evaluaciones fenotípicas, agronómicas e interacciones ecológicas se basan en la combinación de pruebas realizadas en laboratorio y campo ejecutadas por investigadores familiarizados con la producción y evaluación del maíz. En cada una de estas evaluaciones se incluyeron materiales de maíz que contienen el evento (material de prueba) así como la contraparte convencional de fondo genético similar (material de referencia). Además, se incluyeron materiales híbridos comerciales para determinar los valores base de los parámetros analizados que son comunes en el maíz convencional comercial.

El enfoque analítico parte del concepto de familiaridad es útil cuando se realiza la evaluación del impacto potencial al ambiente de un cultivo biotecnológico. El concepto de familiaridad se basa en el hecho de que el cultivo biotecnológico se desarrolla a partir de una variedad vegetal convencional cuyas propiedades y potencial como plaga vegetal son conocidas para los expertos. La familiaridad considera la biología del cultivo, la característica conferida, el ambiente receptor y las interacciones entre estos factores, y proporciona la base para el análisis de riesgo comparativo entre el cultivo biotecnológico y su contraparte convencional. El conocimiento y experiencia con el cultivo es la base para seleccionar los puntos finales y estimar la amplitud de respuestas que podrían ser consideradas como familiares al cultivo. De esta manera, el análisis de características fenotípicas y agronómicas e interacciones ecológicas pueden ser empleadas para comparar la planta biotecnológica con la contraparte convencional, y un subgrupo de datos (por ejemplo ciertas características como por ejemplo dormancia, acame o pérdida de semilla antes de cosecha) pueden ser empleados para estimar si existe mayor potencial de maleza. Con base en todos los datos obtenidos, se puede realizar un análisis sobre la probabilidad de la planta biotecnológica posea un incremento en su potencial de plaga o presenta una modificación significativa en su impacto ecológico comparado a su contraparte convencional.

El cultivo, como sistema biológico que manifiesta variación natural en sus parámetros característicos es analizado en busca de modificaciones no esperadas que pudiesen generarse como resultado de la modificación genética. Para el análisis de riesgo la comparación de los datos de la caracterización vegetal entre el cultivo biotecnológico y el control son considerados en el contexto de su contribución para incrementar su potencial como plaga o de maleza. Las características para las cuales no se identifican diferencias apoyan la conclusión de que no se ha incrementado el potencial de plaga del cultivo biotecnológico comparado al cultivo convencional. Las características para las que se encontrasen diferencias son consideradas para un análisis posterior en etapas o pasos. Cualquier diferencia que sea detectada para una característica se considera en el contexto de que tal diferencia pudiese o no incrementar el potencial de plaga o maleza del cultivo biotecnológico. Finalmente, se emplea un enfoque con el peso de la evidencia que considera todas las características y estudios para estimar el riesgo total de las diferencias y su significancia en términos del incremento en el potencial de plaga. En detalle el proceso de análisis por etapas o pasos que se ha utilizado comprende:

- Pasos 1 & 2. Se realizan análisis estadísticos para datos de sitios combinados y sitios individuales y son evaluados para cada característica cuantificada. Las diferencias que sean detectadas en el análisis del sitio individual deben ser observadas en el análisis de sitios combinados para que sea considerado posteriormente como potenciales efectos adversos en términos de potencial de plaga o maleza. Una diferencia en el análisis de sitios combinados es posteriormente analizado sin importar si se encuentran o no diferencias en el análisis de sitio individual.

- Paso 3. Si se detecta una diferencia en el análisis de sitios combinados a lo largo de múltiples ambientes, entonces el valor medio del material de prueba es analizado relativo al rango de valores de los materiales de referencia.

- Paso 4. Si la media del material de prueba se encuentra fuera de la variación encontrada en los materiales de referencia (por ejemplo, el rango de referencia o el intervalo de tolerancia), la media del material de prueba es considerada en el contexto de los valores comunes conocidos para el cultivo.

- Paso 5. Si la media del material de prueba se encuentra fuera del rango de valores comunes para el cultivo, el material de prueba es considerada como “no familiar” para esa característica. La diferencia detectada en entonces evaluada si es o no adversa en términos de potencial de plaga/maleza.

- Paso 6. Si es identificado un efecto adverso, se realiza un análisis de riesgo a la diferencia detectada. El análisis de riesgo considera la contribución para incrementar el potencial de plaga del cultivo mismo, el impacto de las diferencias detectadas en otras características cuantificadas, y el potencial, así como los efectos de la transferencia de la característica a poblaciones ferales del cultivo o especies sexualmente compatibles.

Los resultados de las evaluaciones fenotípica y agronómica indican que los eventos MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 no poseen características que pudiesen conferir un riesgo de plaga vegetal o resultar en una alteración significativa de impacto ecológico comparado con el maíz convencional. Los datos de las interacciones ecológicas también indican que los eventos MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 no confieren ningún incremento en susceptibilidad o tolerancia a enfermedad en particular, estrés abiótico o insectos, excepto para los objetivo de la característica introducida. Adicional a esta información se cuenta con la caracterización molecular y de composición del evento biotecnológico; los datos del análisis de composición apoyan la conclusión de la equivalencia en composición entre los eventos MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 y el maíz convencional en los niveles de nutrientes, anti nutrientes y metabolitos secundarios en grano y forraje. Tomados en conjunto, estos datos apoyan la conclusión de que los eventos MON-89Ø34-3 y MON-ØØ6Ø3-6 no es probable que posean un incremento en su potencial de riesgo como plaga o que resulte en una alteración significativa de impacto ecológico comparado con el maíz convencional.

En la **carpeta de lineamientos regulatorios**, se proporciona la información de lineamientos regulatorios a seguir en el desarrollo de productos biotecnológicos en el país de origen y los resultados del análisis que fueron presentados para obtener la desregulación.

V.D EN CASO DE QUE EL PROMOVENTE LO CONSIDERE ADECUADO. OTROS ESTUDIOS O CONSIDERACIONES EN LOS QUE SE ANALICEN TANTO LA CONTRIBUCIÓN DEL OGM A LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS AMBIENTALES, SOCIALES, PRODUCTIVOS O DE OTRA ÍNDOLE.

V.E EN CASO DE IMPORTACIÓN, COPIA LEGALIZADA O APOSTILLADA DE LAS AUTORIZACIONES O DOCUMENTACIÓN OFICIAL QUE ACREDITE QUE EL OGM ESTÁ PERMITIDO CONFORME A LA LEGISLACIÓN DEL PAÍS DE ORIGEN.

A continuación se presenta la documentación que acredita que el OGM está permitido en el país de origen para su liberación al ambiente:

- MON-89Ø34-3 (MON89034)

a) Se presenta la documentación que acredita que la semilla proveniente de variedades de maíz MON 89034, está permitida para su utilización como grano, forraje (consumo humano y animal) en Estados Unidos por parte de la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) del 8 de agosto de 2007.
b) Se presenta la documentación que acredita que no existen inconvenientes para la comercialización del producto como alimento humano y para procesamiento del mismo para subproductos destinados del mismo para obtener subproductos destinados al consumo humano. . Expedido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), mediante el oficio No.COFERPRIS/CEMAR/083300CO042333/2008, expedido el 22 de julio de 2008.

- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

a) Se presenta la documentación de desregulación del maíz NK 603 por parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) del 25 de

agosto de 2000.
b) Se presenta la documentación que acredita que la semilla proveniente de variedades de maíz NK 603, está permitida para su utilización como grano, forraje (consumo humano y animal) en Estados Unidos por parte de la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) del 18 de agosto de 2000.
c) Se presenta la documentación que acredita que no se observa inconveniente en comercializar granos de maíz Roundup Ready® NK 603, como materia prima para la industria de alimentos para consumo humano. Expedido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), mediante el oficio SOO/LO2/DNS/023405754/02, expedido el 7 de junio de 2002.

Ver anexo 3

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.

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;

Manejo de plagas en maíz.

Entre las principales plagas lepidópteras del maíz se encuentran el Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith.), el Gusano barrenador del suroeste (*Diatraea grandiosella* Dyar.), el Gusano barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis* F.), y el Gusano elotero (*Heliothis zea*). El control de estas plagas se ha basado tradicionalmente en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro, los cuales han tenido un impacto negativo en el ambiente y el uso irracional de estos productos ha impactado negativamente en insectos benéficos y generado resistencia en las plagas a un gran número de insecticidas (Tabla 10).

Tabla 10.

PLAGA	INGREDIENTE ACTIVO	DOSIS /HA	TOXICIDAD	ÉPOCA DE APLICACIÓN	* DOSIS A COSECHA
Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith.); ** Gusano elotero (*Heliothis zea*)	Thiodicab	375-468 gia 1.0-1.25 litros	**MODERADAMENTE TOXICO**	En el cogollo al detectar el 20% o más de plantas dañadas	5
	Methomyl	360 gia 0.4 kg	**ALTAMENTE TOXICO**		21
	Clorpírifos	360-480 gia 0.75-1.0 litros	**LIGERAMENTE TOXICO**		1
	Permetrina	102-170 gia 0.3-0.5 litros	**MODERADAMENTE TOXICO**		1
	Deltametrina	7.5-12.5 gia 0.3 -0.5 litros	**MODERADAMENTE TOXICO**		15
	L.cyhalotrina	21 gia 0.3 litros			15

* Intervalo entre la última aplicación y la cosecha

** Se pueden aplicar los mismos productos que para gusano cogollero.

Esta tabla se construyó con información del Diccionario de especialidades agroquímicas PLM 2006 y Guías técnicas del INIFAP.

RIESGO

Las materias primas y grandes cantidades de agua necesarias para manufacturar y aplicar insecticidas deben ser consideradas en un esquema de control químico para plagas del maíz. La transportación y espacio utilizado en la aplicación y almacenamiento de insecticidas debe ser también considerado. El uso de insecticidas puede ocasionar la contaminación del suelo, agua y aire y producir grandes cantidades de envases de plástico en el campo.

Manejo de maleza en maíz.

El rendimiento del maíz en cultivo, en las primeras fases de su desarrollo, puede ser afectado seriamente por la competencia ejercida por la maleza, asimismo, la maleza puede ocasionar daños en forma indirecta al propiciar el incremento de plagas de insectos, enfermedades y roedores, así como dificultar la cosecha, afectar la calidad de la misma, e influir en la incidencia de la maleza en los terrenos debido a su producción de semilla. Para evitar el daño ocasionado por la maleza el productor asigna gastos para su control a través de métodos manuales (uso de azadón), mecánicos (escardas) y químicos (herbicidas).

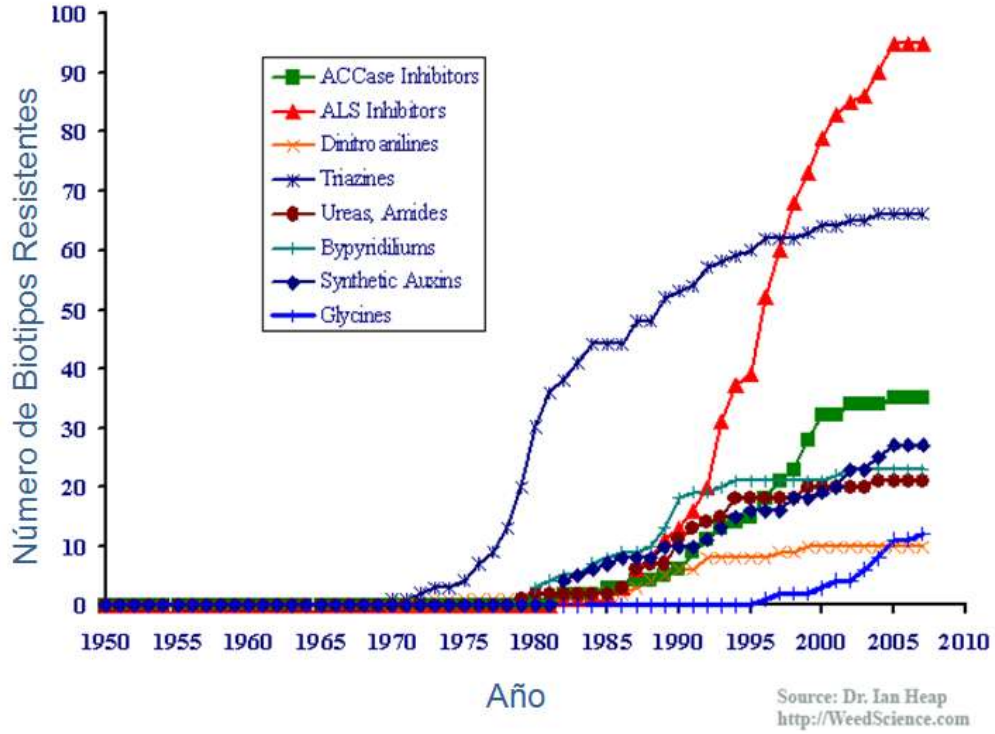
El control químico de la maleza en las áreas productoras de maíz consiste en una aplicación total de herbicidas en preemergencia, así como de aplicaciones dirigidas de herbicidas postemergentes. La aplicación de herbicidas preemergentes generalmente incluye la mezcla de un producto para el control de maleza de hoja ancha y otro para zacates, debido a que el espectro de acción de cada producto en la mezcla no les permite eliminar todas las especies de maleza que se presentan en el maíz. Por otro lado, los herbicidas postemergentes que se comercializan actualmente presentan problemas de selectividad y su aplicación requiere del uso de equipos especiales de aspersión con el objeto de reducir el riesgo de fitotoxicidad al cultivo por el uso de herbicidas totales, otra desventaja de este tipo de aplicaciones es que con este método no se elimina la maleza presente en la hilera del cultivo, lo cual indica que el método de control químico convencional depende aún de las escardas mecánicas y del control manual para lograr un eficiente control de maleza, (Tabla 11).

Los herbicidas recomendados para la región Norte de México son los siguientes:
Atrazina, Alaclor, metolaclor, 2,4-D Amina, Nicosulfurón, Fluoroxipir, Prosulfurón, Paraquat.

Tabla 11. Toxicidad en los mamíferos de herbicidas representativos y productos químicos de referencia comunes en orden decreciente de DL50. oral aguda para ratas -mg/kg de peso corporal.

Herbicida	**DL_{50}**	**Herbicida**	**DL_{50}**
TOXICIDAD ALTA*			
Paraquat	120	Endotal amina	206
Bromoxynil	190	Diquat	231
Bromoxynil octonoato	to 365	Cyanazina	288
Toxicidad moderada*			
Diclofop-metil	563-693	Propanil	1870
2, 4-D sal sódica	666-805	Glufosinato	2000
2, 4-D isopropil	700	Fenoxaprop-etil	2357
CDAA	750	Metolachlor	2828
MCPA	800	Atrazina	3080
Metribuzin	1090	Diuron	3328
EPTC	1652	Fluazifop-butyl	3330
Alachlor	1800	Aciflurofen	3460
BAJA TOXICIDAD*			
Asulam	>5000	Imazethapyr	>5000
Dalapon	>5000	Simazina	>5000
Glifosato	>5000	Sulfometuron-metil	>5000
Productos químicos comunes	DL_{50}	Toxicidad*	
Nicotina	50	Muy alta	
Cafeína	200	Alta	
Aspirina	1750	Moderada	
Sal común	3000	Moderada	

Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120)



Se muestran los biotipos resistentes a los diferentes tipos de herbicidas empleados (por método de acción) para controlar la maleza.

VII. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN EXPEDIDA POR SALUD CUANDO EL OGM TENGA FINALIDADES DE SALUD PÚBLICA O BIORREMEDIACIÓN.

No Aplica

VIII. LA PROPUESTA DE LA VIGENCIA PARA EL PERMISO Y LOS ELEMENTOS EMPLEADOS PARA DETERMINARLA.

La presente solicitud de liberación al ambiente en etapa experimental para el organismo genéticamente modificado MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6, cubre el ciclo Otoño-Invierno (OI) 2009 en el Estado de Sonora en los Municipios de Cajeme, San Ignacio Río Muerto y Bácum.

ESTADO	CICLO	VENTANA DE SIEMBRA	VENTANA DE COSECHA
Sonora	**OI**	15 agosto 2009 - 23 de octubre de 2009	12 de enero de 2010 – 22 de marzo de 2010

IX DOS COPIAS EN FÍSICO.

X DOS DISCOS CON INFORMACIÓN DE CARÁCTER PÚBLICO.

XI OCHO DISCOS CON INFORMACION DE CARÁCTER CONFIDENCIAL.

Anexamos los materiales de referencia que permitan la detección, identificación y cuantificación del maíz genéticamente modificado que pretende liberarse.

ANEXO 2

INFORMACIÓN DE SOPORTE PARA LA DISTANCIA PROPUESTA DE ASILAMIENTO.

Flujo génico en maíz.

Probabilidad del flujo génico en maíz

El flujo de genes en maíz (Zea mays L.) está estrechamente asociado con la biología de las inflorescencias estaminadas y pistiladas. El maíz es una especie de polinización cruzada mediada por el viento que produce polen en grandes cantidades. Una espiga de tamaño normal de un maíz híbrido puede producir hasta 25 millones de granos de polen (Kiesselbach, 1999). El grano de polen tiene una media para el diámetro de aproximadamente 100-106 micras (Rodríguez et al., 2006). La dispersión del polen está determinada por una diversidad de factores ambientales y físicos. La dirección del viento, las turbulencias y la velocidad del viento se encuentran directamente relacionadas al movimiento del polen (Jones and Brooks, 1950; Di-Giovanni and Kevan, 1991). Otros factores tales como la densidad del polen, la densidad y la viscosidad del aire, la velocidad de sedimentación del polen y el radio del polen parecen influir en el transporte y la deposición del polen (Paterniani and Sort, 1974; Di-Giovanni et al., 1995; Aylor, 2002).
Una vez en la atmósfera, los granos de polen deben mantenerse viables el tiempo suficiente para que alcancen a llegar a un estigma viable para completar el proceso de la polinización. En promedio el grano de polen pierde el 100% de viabilidad después de dos horas de exposición atmosférica (Luna et al., 2001; Aylor, 2003). Típicamente los estigmas proporcionan a los granos de polen la humedad y nutrientes que le permiten germinar. El crecimiento del tubo polínico generalmente es visible dentro de los 30 minutos que el grano de polen ha llegado a un estigma receptivo y la fertilización ocurre dentro de aproximadamente 24 horas (Kiesselbach, 1999).

Flujo de genes durante la realización de pruebas de campo

El flujo de genes en maíz puede presentarse en diferentes niveles durante el desarrollo y la caracterización de materiales. Estos niveles incluyen a los materiales para mejoramiento, producción de semilla parental, producción de semilla comercial o campos comerciales de producción (Burris, 2002). La escala de producción abarca desde una muy pequeña con fines de investigación hasta una muy grande de millones de hectáreas para una liberación comercial. Todos los principios biológicos del polen y los estigmas aplican al flujo génico en cualquier etapa de evaluación. El resultado esperado es minimizar el flujo de genes no deseados sin importar la fuente, ya sean genes de materiales biotecnológicos o derivados de maíces convencionales.

Investigaciones de campo realizadas en México para investigar distancias de aislamiento muestran que la polinización cruzada se presenta a una distancia máxima de 200 metros de la fuente de polen. No se observaron eventos de polinización cruzada a 300 m (Luna et al., 2001).
Otros estudios han mostrado resultados similares donde la distancia máxima en la cual se detectó hibridación fue de 300-350 m de la fuente de polen (Ireland et al., 2006; Weekes et al., 2007).

Controlar el flujo de genes a niveles de producción de parentales y semilla comercial es crítico para poder proporcionar a los agricultores los niveles de pureza requeridos por las agencias internacionales de comercio y es una referencia útil para los investigadores (Bateman, 1947; Raynor et al., 1972; Jemison and Vayda, 2001). Las agencias certificadoras de los países son las responsables del establecimiento de normas oficiales ara calificar la semilla certificada. Estas normas establecen las distancias mínimas a observar para conseguir el aislamiento requerido y pueden ser modificadas por 1) presencia de surcos adicionales que se siembran como bordo y que actúan como barrera para el flujo génico mediado por polen (Jones and Brooks, 1950); el tamaño del campo y del bloque productor; 3) presencia de barreras naturales; 4) y diferencias en fechas de floración. Cuando no se tienen surcos de bordo o solamente se siembra uno, se requiere típicamente de una distancia mínima de 125-200 m entre los parentales del híbrido que se produce y cualquier otro maíz del mismo color de semilla, madurez o tipo de endospermo (Goggi et al., 2006; Goggi, et al, 2007; Halsey et al., 2005; Stevens et al., 2004). El uso de transgenes típicamente involucra un gen que es empleado de manera heterocigota o hemicigota dominante. Como resultado, solo la mitad del polen que se produce en una plantación comercial es transgénico debido a que solamente un parental contiene transgen. Esto reduce a la mitad la oportunidad de entrecruzamiento de lo que se esperaría entre un campo transgénico con otro campo (Ma et al. 2004; Jemison and Vayda, 2006; Messenger et al., 2006; Pla et al., 2006, Weekes et al., 2007).

Por lo anterior, para conseguir la contención del flujo de genes mediada por polen en maíz contamos con diferentes metodologías, mismas que nos ofrecen la flexibilidad necesaria para el desarrollo de evaluaciones experimentales que cumplan con las medidas de bioseguridad de aislamiento y brinden la información requerida.

Tabla 1. Resumen de literatura publicada sobre entrecruzamiento de maíz.

Distancia del polinizador (m)	Entrecruzamiento reportado (%)	Comentarios	País	Referencia
12-15	1	Se investigaron frecuencias por distancias. Experimento de un ciclo. Se empleo como masculino un híbrido simple amarillo y femenino un híbrido simple blanco para calcular valores de entrecruzamiento.	UK	Bateman, A.J. 1947.
0 25 75 125 200 300 400 500	28.6 - - - - 1 - -	Se investigaron frecuencias por distancias. Experimento de tres ciclos. Híbridos simples masculino y femenino Fuente de polen amarillo dentado y receptor un blanco dulce.	USA	Jones and Brooks. 1950
1 7.7 15.3 32 60	N/A	Se investigaron la dispersión y la deposición. Experimento de dos ciclos. Dos machos y dos hembras. Deposición de polen por unidad de área a 60 m = 0.2%. Concentraciones de polen a 60 m igual 1%.	USA	Raynor et al., 1972
1 10 20 30 34	2.25 0.02 0.008 0.005 0.003	Se investigó la dispersión del polen de maíz. Híbrido simple. El flujo de genes disminuye a mayor distancia de la fuente. Correlación más estrecha para flujo de genes entre número de plantas que distancia física.	Brasil	Paterniani and Stort 1974
30 40 350	1.04 0.03 0	Se investigó frecuencias por distancia. Estudio de dos ciclos. Híbrido simple macho RR y hembra no RR.	USA	Jemison and Vayda, 2001

Distancia del polinizador (m)	Entrecruzamiento reportado (%)	Comentarios	País	Referencia
100 150 200 300 400	0.01 - 0.01 - -	Fse investigó frecuencias por distancia y viabilidad del polen. Estudio de dos ciclos. Se utilizó como gen marcador el color púrpura para determinar movilidad del polen. La viabilidad del polen fue de 1 h en el año más caliente y seco y de 2 hs en el año menos caliente y más húmedo.	México	Luna et al. 2001
1 28	82 1	Se estudió frecuencia por distancia. Tres años, tres sitios. Híbridos simples macho y hembra/localidad.	Canada	Ma et al., 2004
200 300	0.03 0.02	Se investigó la eficacia del desespigue para la contención de polen. Se emplearon 4 materiales como fuente de polen: 1 amarillo, 2 GMs (Bt y RR) y 1 IT (tolerante a imidazoliniona). Como trampa de polen se utilizaron dos materiales blancos y un híbrido con esterilidad masculina. Estudio de dos ciclos con tres localidades.	USA	Stevens et al., 2004
30 60 120 240 480 750	0.1 - 1.0 0.1 - 1.0 0.01 – 0.1 0.01 – 0.1 0.001- 0.01 <0.001	Se investigaron frecuencias por distancia. Se emplearon un macho y 7 hembras con diferente RM. El parental masculino fuente de polen contenía los marcadores genéticos P1-rr and R1-nj. Cuando un grano de polen fertilizaba las plantas amarillas se presentaba una coloración púrpura en el grano. Estudio de dos ciclos y dos sitios.	USA	Halsey et al., 2005
1.8 9.4 20.6 35.8 200	2 2 1.5 1 0.5	Se investigó aislamiento por distancia. Los objetivos fueron i) evaluar las prácticas actuales de aislamiento de la industria en la producción de semillas híbridas que satisfacen los más altos estándares de pureza genética, y ii) identificar las prácticas que mejorarán el aislamiento reproductivo en los campos de producción de semilla híbrida. Tres años en 315	USA	Ireland et al., 2006

Distancia del polinizador (m)	Entrecruzamiento reportado (%)	Comentarios	País	Referencia
		campos. Se evaluaron múltiples híbridos de 24 compañías semilleras.		
3 6 121 140	9 10 0.02 0.04	Frecuencias de entrecruzamiento entre campos de maíces GM y no GM. Dos localidades/un ciclo. Dos híbridos Bt y multiples híbridos convencionales.	España	Messeguer et al., 2006
1 10 35 100 150 200 250	29.9 2.5 0.4 0.03 0.01 0.007 0.002	Se investigaron las frecuencias de polinización por distancia. La polinización fue cuantificada al determinar el entrecruzamiento de una parcela de maíz transgénico en un campo de producción de maíz convencional. Se utilizó una combinación de tres genes marcadores para detectar el entrecruzamiento: y1 (gen para color de semilla), Bt y RR. Dos ciclos/dos sitios. Híbridos simples macho y hembra.	USA	Goggi et al., 2006
0 4.6 18.3	0.9 at distances ≥ 20m	Eficacia de los surcos de borde y distancia de aislamiento para prevenir el entrecruzamiento. Se emplearon juegos de datos para realizar predicciones que permitieran reducir el entrecruzamiento a niveles inferiores al 0.9%.	USA	Gustafson et al., 2006
0 2 5 10 20 40 80	5-12 2-7 1-3 1-3 0.9 0.5 0	Se investigaron mediante PCR las frecuencias de entrecruzamiento. El principal objetivo de este estudio fue comparar un método en base a PCR con valores reales de entrecruzamiento determinados por análisis fenotípico. Se emplearon cuatro híbridos Bt y un no Bt como machos y hembra, respectivamente. Un año/un sitio.	España	Pla et al., 2006
0 2	10.5 34.8	Se investigó la frecuencia de polinización cruzada por distancia (expresada como % DNA GM). La	UK	Weekes et al., 2007

Distancia del polinizador (m)	Entrecruzamiento reportado (%)	Comentarios	País	Referencia
5 10 15 20 25 40 50 70 75 80 100 120 142 147 150 160 200	9.8 12.2 0.5 8.2 4.0 3.7 5.9 0.13 0.28 0.12 2.3 0.16 0.06 0.00 5.40 0.00 0.24	investigación se realizó en la evaluación a escala de grandes fincas (FSE) a lo largo del Reino Unido.		
1 10 35 100	42.2 6.3 1.3 0.1	Se investigaron frecuencias de polinización cruzada por distancia. Fuente de polen híbrido amarillo RR/Bt; receptor híbrido no GM. Mayor entrecruzamiento cuando el híbrido blanco fue desespigado.	USA	Goggi, et al., 2007

REFERENCIAS

Aylor, D.E. 2002. Settling speed of maize (Zea mays) pollen. Aerosol Sci. 33:1601-1607.

Bateman, A.J. 1947. Contamination of seed crops. II. Wind Pollination. Heredity 1:235-246.

Burris, J.S. 2002. Adventitious pollen intrusion into hybrid maize seed production fields. Representing the Association of Official Seed Certifying Agencies. American Seed Trait Association (ASTA). STA Statements and Comments.

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

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

Goggi A.S., P. Caragea, H. Lopez-Sanchez, M. Westgate, R. Arritt, C. Clark. 2006. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. Field Crops Res. 99: 147–157.

Goggi, A.S., Lopez-Sanchez, H., Caragea, P., Westgate, M., Arritt, R. and Clark, C.A. 2007. Gene flow in maize fields with different local pollen densities. Int. J. of Biom. 51(6):493-503.

Gustafson, D.I., I.O. Brants, M.J. Horak., M. Remund, E.W. Rosenbaum, and J.K. Soteres. 2006. Empirical modeling of genetically modify maize grain production practices to achieve European union labeling thresholds. Crop Sci. 46:2133-2140.

Halsey, M.E., M.R. Kirk, A.D. Christopher, Q. Mick, J.E. Philip, and A.B. Sharon. 2005. Isolation of Maize from Pollen-Mediated Gene Flow by Time and Distance. Crop Sci. 45:2172–2185.

Ireland, D.S., D.O. Wilson, Jr., M.E. Westgate, J.S. Burris, and M.J. Lauer. 2006. Managing Reproductive Isolation in Hybrid Seed Corn Production. Crop Sci. 46:1445–1455.

Jemison, J.M. Jr. and & Vayda M.E. 2001. Cross pollination from genetically engineered corn: Wind transport and seed source. AgBioForum 4(2): 87-92.

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

Kiesselbach, T.A. 1999. The structure and reproduction of corn. 50th Anniversary Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Luna, V. S., J.M. Figueroa, B.M. Baltazar, R.L. Gomez, R. Townsend and J.B. Schoper 2001. Maize Pollen Longevity and Distance Isolation Requirements for Effective Pollen Control. Crop Sci. 41:1551-1557.

Ma, B.L. K.D. Subedi, and L.M. Reid. 2004. Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. Crop Sci. 44:1273–1282.

Messeguer, J., G. Peñas, J. Ballester, M. Bas, J. Serra, J. Salvia, M. Palaudelmàs and E. Melé. 2006. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. Plant Biotech. J. 4: 633–645

Paterniani, E. and A.C. Stort. 1974. Effective maize pollen dispersal in the field. Euphytica 23:129-134.

Pla, M., J. La Paz, G. Peñas, N. Garcia, P. Montserrat, T. Esteve, J. Messeguer and E. Mele. 2006. Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated gene flow from GM to conventional maize in a field study. Transg. Res. 15:219–228

Raynor, G.S., C.O. Eugene, and V.H. Janet. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. Agron. J. 64:420–427.

Rodriguez, J.G.F., J.J. Sanchez G. Baltazar, M.B. De la Cruz L., Santacruz-Ruvalcaba, E., Ron, J.P. and Schoper, J.B. 2006. Characterization of floral morphology and synchrony among Zea species in Mexico. Maydica 51: 383-398.

Stevens, W.E., S.A. Berberich, P.A. Sheckell, C.C. Wiltse, M.E. Halsey, M.J. Horak, and D.J. Dunn. 2004. Optimizing pollen confinement in maize grown for regulated products. Crop Sci. 44:2146–2153

Weekes, R., T. Allnutt, C. Boffey, S. Morgan, M. Bilton, R. Daniels and C. Henry. 2007. A study of crop-to-crop gene flow using farm scale sites of fodder maize (Zea mays L.) in the UK. Transg. Res.16:203–211.

ANEXO 3

- MON-89Ø34-3 (MON89034)

Se presenta la documentación que acredita que la semilla proveniente de variedades de maíz MON 89034, está permitida para su utilización como grano, forraje (consumo humano y animal) en Estados Unidos por parte de la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) del 8 de agosto de 2007.

Se presenta la documentación que acredita que no existen inconvenientes para la comercialización del producto como alimento humano y para procesamiento del mismo para subproductos destinados del mismo para obtener subproductos destinados al consumo humano. . Expedido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), mediante el oficio No.COFERPRIS/CEMAR/083300CO042333/2008, expedido el 22 de julio de 2008.

a) FDA- MON-89Ø34-3 (MON89034) - 2007

STATE OF MISSOURI

Office of Secretary of State

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by JILL S. MARTIN
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of JILL S. MARTIN - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 22ND day of MAY, 2008.
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 190584
9. Seal/Stamp

SEAL OF THE SECRETARY OF STATE
MISSOURI

10. Signature:

Robin Carnahan
Secretary of State

Comm. 27 (01-01)

MONSANTO
imagine

MONSANTO COMPANY
800 NORTH LINDBERGH BLVD
ST. LOUIS, MISSOURI 63167
http://www.monsanto.com

STATE OF MISSOURI)
)
COUNTY OF ST. LOUIS)

I, Jill S. Martin, a Notary Public in and for said state, do certify that on May 21, 2008, I carefully compared the attached photocopy of the letter from the U.S. Department of Health and Human Services dated August 8, 2007 from Laura M. Tarantino, Director to Dr. Natalia Bogdanova and the original I now hold in my possession. It is a complete, full, true and exact photocopy of the document it purports to reproduce.

JSMartin
Notary Public

My Commission Expires: 8/2/2009

JILL S. MARTIN
Notary Public - Notary Seal
State of Missouri - County of St. Charles
My Commission Expires Aug. 2, 2009
Commission #05743244

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

Public Health Service

Food and Drug Administration
College Park, MD 20740

AUG 0 8 2007

Natalia N. Bogdanova, D.V.M.
Regulatory Affairs Manager
Monsanto Company
800 North Lindbergh Blvd
St. Louis, MO 63167

Dear Dr. Bogdanova:

This is in regard to Monsanto Company's (Monsanto) consultation with the Food and Drug Administration (FDA) (Center for Food Safety and Applied Nutrition and Center for Veterinary Medicine) on its genetically engineered corn event MON 89034. According to Monsanto, corn event MON 89034 is genetically engineered to express the insect control proteins Cry1A.105 and Cry2Ab2, which provide protection from a broad spectrum of Lepidopteran insect pests. All materials relevant to this notification have been placed in a file designated BNF 107. This file will be maintained in the Office of Food Additive Safety.

As part of bringing the consultation regarding this product to closure, Monsanto submitted a summary of its safety and nutritional assessment of the genetically engineered corn on October 13, 2006. Monsanto provided additional clarifying information to FDA on January 18 and on March 8, 2007. These communications informed the FDA of the steps taken by Monsanto to ensure that this product complies with the legal and regulatory requirements that fall within FDA's jurisdiction. Based on the safety and nutritional assessment Monsanto has conducted, it is our understanding that Monsanto has concluded that corn grain and forage derived from the new variety are not materially different in composition, safety, and other relevant parameters from corn grain and forage currently on the market and that genetically engineered corn event MON 89034 does not raise issues that would require premarket review or approval by FDA.

Because the Environmental Protection Agency (EPA) regulates pesticidal substances, FDA has not evaluated the information related to the safety of the Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins. It is Monsanto's responsibility to obtain all appropriate clearances, including those from the EPA and the United States Department of Agriculture, before marketing food or feed derived from corn event MON 89034.

RE001508

RECEIVED
AUG 13 2007
06-CR-161F

Based on the information Monsanto has presented to FDA, we have no further questions concerning grain and forage derived from corn event MON 89034 at this time. However, as you are aware, it is Monsanto's continued responsibility to ensure that foods marketed by the firm are safe, wholesome, and in compliance with all applicable legal and regulatory requirements.

Sincerely yours,

Laura M Tarantino

Laura M.Tarantino, Ph.D.
Director
Office of Food Additive Safety
Center for Food Safety
and Applied Nutrition

[Papel membretado de MONSANTO]

MONSANTO
imagine

MONSANTO COMPANY
800 North Lindbergh Blvd
St. Louis, Missouri 63167
http://www.monsanto.com

ESTADO DE MISSOURI)
)
CONDADO DE SAN LUIS)

Yo, Jill S. Martin, Notario Público en y del citado estado, certifico que el día 16 de mayo de 2008 comparé cuidadosamente la fotocopia que se adjunta a la carta emitida por la Secretaría de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos [*U.S. Department of Health and Human Services*] con fecha del día 8 de agosto de 2007 por parte de Laura M. Tarantino, Directora, a la Dra. Natalia Bogdanova con el original que ahora tengo en mi posesión. Es una copia íntegra, completa, fiel y exacta del documento que pretende reproducir.

[Firmado]
Notario Público

Mi Mandato Vence el: 2/8/2009

[Sello estampado que dice: JILL S. MARTIN Notario Público - Sello Notarial Estado de Missouri - Condado de St. Charles. Mi Mandato Vence el día 2 de agosto de 2009. Mandato #05743244].

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

[Papel membretado de la Secretaría de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. Servicios de Salud Pública. Dirección de Alimentos y Medicamentos. Collage Park, MD 20740].

8 de agosto de 2007

Dra. en Medicina Veterinaria Natalia N. Bogdanova
Directora de Asuntos Regulatorios
Monsanto Company
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167

Estimado Dra. Bogdanova:

La presente es con relación a la consulta planteada por Monsanto Company (Monsanto) a la Dirección de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (Centro de Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada y Centro de Medicina Veterinaria) sobre su evento de maíz diseñado genéticamente MON 89034. De acuerdo con Monsanto, el evento de maíz MON 89034 está diseñado genéticamente para expresar las proteínas para control de insectos Cry1A.105 y Cry2Ab2, los cuales proporcionan protección para un amplio espectro de plagas de insectos lepidópteros. Todos los materiales relevantes a esta notificación se han colocado en un archivo designado como BNF 107. Este archivo se conservará en la Dirección de Inocuidad Aditiva de los Alimentos. [*Office of Food Additive Safety*].

Como parte de llevar la consulta respecto de este producto a término, Monsanto presentó un resumen de su evaluación nutrimental y de inocuidad del maíz diseñado genéticamente el día 13 de octubre de 2006. Monsanto presentó información adicional aclaratoria ante la FDA el día 18 de enero y el día 8 de marzo de 2007. Estas comunicaciones informaban a la FDA con respecto a los pasos que había tomado Monsanto para asegurar que este producto cumplía con los requisitos legales y regulatorios que caen dentro de la jurisdicción de la FDA. Con base en la evaluación nutrimental y de inocuidad que realizó Monsanto, entendemos que Monsanto ha concluido que el grano de maíz y el forraje derivado de la nueva variedad no son diferentes de manera importante en su composición, inocuidad y demás parámetros relevantes del grano de maíz y del forraje que se encuentra actualmente en el mercado y que el evento de maíz diseñado genéticamente MON 89034 no plantea cuestiones que pudiesen requerir una revisión previa a la comercialización o aprobación por parte de la FDA.

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

Debido a que la Agencia para la Protección del Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) regula substancias de plaguicidas, la FDA no ha evaluado la información con respecto a la inocuidad de las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2. Es responsabilidad de Monsanto el obtener todas las autorizaciones adecuadas, incluyendo las autorizaciones de la EPA y de la Secretaría de Agricultura de los Estados Unidos antes de comercializar los alimentos y el forraje que se deriven del evento de maíz MON 89034.

[Código de Barras]
R E 0 0 1 5 0 8

[Sello estampado que dice: RECIBIDO. 13 de agosto de 2007. 06-CR-161F].

Página 2 – Dra. Bogdanova

Con base en la información que Monsanto ha presentado ante la FDA, en este momento no tenemos preguntas adicionales con respecto al grano y al forraje derivados del evento de maíz MON 89034. Sin embargo, como es de su conocimiento, es la responsabilidad continua de Monsanto el asegurarse que los alimentos que comercialice la empresa sean inocuos, saludables y que cumplan con todos los requisitos legales y regulatorios que sean aplicables.

Atentamente,

[Firmado]
Dra. Laura M. Tarantino
Directora
Dirección de Inocuidad Aditiva de Alimentos
Centro para la Inocuidad de los Alimentos
Y Nutrición Aplicada

****

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de [illegible]

****

Yo, **Fernando Orea**, Perito Traductor autorizado por el **Consejo de la Judicatura Federal** con Número de Registro **P.151-2002**, por acuerdo publicado en el **Diario Oficial** de la Federación el día **30 de noviembre del año 2007**, en el presente acto certifico que la traducción anterior del Inglés al Español que se incluye en (3) páginas de texto, es a mi leal saber y entender, fiel y completa.

México, Distrito Federal, 26 de mayo del año 2008.

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por [illegible] publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

b) COFEPRIS- MON-89Ø34-3 (MON89034) -2008.

"2008, Año de la Educación Física y el Deporte"

COMISION FEDERAL PARA LA PROTECCION
CONTRA RIESGOS SANITARIOS

SECRETARÍA DE SALUD

SALUD

Of. No. COFEPRIS/CEMAR/083300CO042333/2008.
Asunto: No inconveniencia

México, D.F. 22 JUL. 2008

MONSANTO COMERCIAL, S. A. DE C. V.
Atención: Dr. Juan Manuel de la Fuente
Especialista Regulatorio
Prolongación Paseo de la Reforma No. 1015
Torre "A", Piso 21
Desarrollo Santa Fe, 01376, México, D. F.
Presente

Con fundamento en los artículos 4º, párrafo tercero, 8º y 16 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; 39 fracciones XII y XXI de la Ley Orgánica de la Administración Pública General; 17 bis fracción I, 194 fracción I, 197, 215 fracción IV, 282 bis y 282 bis-1 de la Ley General de Salud; art. 1 fracción XVI, y 164 y 165 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, y con relación a su solicitud de evaluación de la inocuidad del maíz modificado genéticamente, evento MON-89034, con número de entrada 06330060050920, cuyo alcance con información adicional ingresó con el número de trámite 083300CO042333, le comunico que una vez analizada la información presentada, el grupo técnico evaluador ha concluido que no se han detectado inconvenientes para la comercialización del producto como alimento humano y para procesamiento del mismo para obtener subproductos destinados al consumo humano.

Sin perjuicio de que si esta Secretaría tiene conocimiento posterior de que dicho producto represente un riesgo para la salud de la población, se reserva el derecho de aplicar las medidas a que hubiere lugar, Monsanto Comercial, S. A. de C. V. tiene la responsabilidad de asegurar la inocuidad del producto y cumplir con la legislación aplicable a la materia.

Atentamente,
La Comisionada de Evidencia y Manejo de Riesgos

ROCÍO ALATORRE EDEN-WYNTER

MEAIAAG/SSM

Monterrey No.33 10o PISO, Col. Roma, Del. Cuauhtémoc, México, D.F. C.P. 06700
Tel: 01 (55) 50-80-52-00 Ext. 1403 www.cofepris.gob.mx

- MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

a) **Se presenta la documentación de desregulación del maíz NK 603 por parte del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) del 25 de agosto de 2000.**
b) **Se presenta la documentación que acredita que la semilla proveniente de variedades de maíz NK 603, está permitida para su utilización como grano, forraje (consumo humano y animal) en Estados Unidos por parte de la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) del 18 de agosto de 2000.**
c) **Se presenta la documentación que acredita que no se observa inconveniente en comercializar granos granos de maíz Roundup Ready® NK 603, como materia prima para la industria de alimentos para consumo humano. Expedido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), mediante el oficio SOO/LO2/DNS/023405754/02, expedido el 7 de junio de 2002.**

c) USDA- MON- ØØ6Ø3-6 (NK603)- 2000

STATE OF MISSOURI

Office of Secretary of State

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by JILL S. MARTIN
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of JILL S. MARTIN - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 22ND day of MAY, 2008.
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 190588
9. Seal/Stamp
10. Signature:

SEAL OF THE SECRETARY OF STATE MISSOURI

Robin Carnahan

Secretary of State

Comm. 27 (01-01)

MONSANTO
imagine

MONSANTO COMPANY
800 NORTH LINDBERGH BLVD
ST. LOUIS, MISSOURI 63167
http://www.monsanto.com

STATE OF MISSOURI)
)
COUNTY OF ST. LOUIS)

I, Jill S. Martin, a Notary Public in and for said state, do certify that on May 21, 2008, I carefully compared the attached photocopy of the letter from the U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Services dated August 25, 2000 from Marilyn Kay Peterson, Regulatory Specialist to Dr. Kent Croon and the original I now hold in my possession. It is a complete, full, true and exact photocopy of the document it purports to reproduce.

Jill S. Martin
Notary Public

My Commission Expires: 8/2/2009

JILL S. MARTIN
Notary Public - Notary Seal
State of Missouri - County of St. Charles
My Commission Expires Aug. 2, 2009
Commission #05743244

United States
Department of
Agriculture

Animal and
Plant Health
Inspection Service

4700 River Road
Riverdale, MD 20737

AUG 25 2000

Dr. Kent Croon
Maize Traits Lead - Regulatory Affairs
Monsanto Company
700 Chesterfield Parkway North
BB1K
St. Louis, MO 63198

Dear Dr. Croon:

Your petition number 00-011-01p for an extension of a determination of nonregulated status for roundup ready corn line NK603 has been approved. A notice advising the public of our determination that the subject corn line is no longer considered a regulated article under 7 CFR part 340 will be published in the Federal Register on August 30, 2000.

The extension will not be effective until September 29, 2000.

Copies of the environmental assessment and finding of no significant impact prepared for corn line NK603 are enclosed. Should you have any questions about these documents, please do not hesitate to contact us at Area Code (301) 734-4885.

Sincerely,

Marilyn Kay Peterson

Marilyn Kay Peterson
Regulatory Specialist

Enclosures

AA047196

[Papel membretado de MONSANTO]

MONSANTO
imagine

MONSANTO COMPANY
800 North Lindbergh Blvd
St. Louis, Missouri 63167
http://www.monsanto.com

ESTADO DE MISSOURI)
)
CONDADO DE SAN LUIS)

Yo, Jill S. Martin, Notario Público en y del citado estado, certifico que el día 16 de mayo de 2008 comparé cuidadosamente la fotocopia que se adjunta a la carta emitida por la Secretaría de Agricultura de los Estados Unidos en su división de Servicios de Inspección de Salubridad Animal y Vegetal [*U.S. Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Services*] con fecha del día 25 de agosto del año 2000 por parte de Marilyn Kay Peterson, Especialista Regulatorio al Dr. Kent Croon con el original que ahora tengo en mi posesión. Es una copia íntegra, completa, fiel y exacta del documento que pretende reproducir.

[Firmado]
Notario Público

Mi Mandato Vence el: 2/8/2009

[Sello estampado que dice: JILL S. MARTIN Notario Público - Sello Notarial Estado de Missouri - Condado de St. Charles. Mi Mandato Vence el día 2 de agosto de 2009. Mandato #05743244].

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

[Papel membretado de la Secretaría de Agricultura de los EE.UU. Servicios de Inspección de Salud Animal y Vegetal. 4700 River Road. Riverdale, MD 20737].

25 de agosto de 2000

Dr. Kent Croon
Director de Características del Maíz – Asuntos Regulatorios
Monsanto Company
700 Chesterfield Parkway North
BB1K
St. Louis, MO 63198

Estimado Dr. Croon

Su solicitud con el número 00-011-01p para una prórroga de una determinación de condición de no regulado para la línea del maíz roundup ready NK603 ha sido aprobada. Se publicará en el Registro Federal el día 30 de agosto del año 2000 un aviso que notifica al público con respecto a nuestra determinación de que la línea de maíz objeto no se considera por más tiempo un artículo regulado en términos del título 7, parte 340 del Código Federal de Reglamentos de los EE.UU. (CFR).

La prórroga no entrará en vigor sino hasta el día 9 de septiembre del año 2000.

Se adjuntan copias de la evaluación ambiental y de la divulgación de no existencia de impacto significativo preparada para la línea de maíz NK603. En caso de tener cualquier pregunta con respecto a estos documentos, no dude en ponerse en contacto con nosotros al Código de Área (301) 734-4885.

Atentamente,
[Firmado]
Marilyn Kay Peterson
Especialista Regulatorio

Anexos

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

APHIS

Protegiendo a la Agricultura Estadounidense

APHIS es una dependencia de los Programas de Comercialización y Regulatorios de USDA (Secretaría de Agricultura de los EE.UU.).

Un Empleador y Proveedor que Favorece la Igualdad de Oportunidades.

[Código de Barras]

AA047196

****

Yo, **Fernando Orea**, Perito Traductor autorizado por el **Consejo de la Judicatura Federal** con Número de Registro **P.151-2002**, por acuerdo publicado en el **Diario Oficial** de la Federación el día **30 de noviembre del año 2007**, en el presente acto certifico que la traducción anterior del Inglés al Español que se incluye en (3) páginas de texto, es a mi leal saber y entender, fiel y completa.

México, Distrito Federal, 26 de mayo del año 2008.

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por e
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-200
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 200

d) FDA- MON- ØØ6Ø3-6 (NK603) - 2000

STATE OF MISSOURI

Office of Secretary of State

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by JILL S. MARTIN
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of JILL S. MARTIN - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 22ND day of MAY, 2008.
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 190589
9. Seal/Stamp
10. Signature:

SEAL OF THE SECRETARY OF STATE MISSOURI

Robin Carnahan

Secretary of State

Comm. 27 (01-01)

MONSANTO
imagine

MONSANTO COMPANY
800 NORTH LINDBERGH BLVD
ST. LOUIS, MISSOURI 63167
http://www.monsanto.com

STATE OF MISSOURI)
)
COUNTY OF ST. LOUIS)

I, Jill S. Martin, a Notary Public in and for said state, do certify that on May 21, 2008, I carefully compared the attached photocopy of the letter from the U.S. Department of Health and Human Services dated October 18, 2000 from Alan M. Rulis, Director to Dr. Kent A. Croon and the original I now hold in my possession. It is a complete, full, true and exact photocopy of the document it purports to reproduce.

JSMartin
Notary Public

My Commission Expires: 8/2/2009

JILL S. MARTIN
Notary Public - Notary Seal
State of Missouri - County of St. Charles
My Commission Expires Aug. 2, 2009
Commission #05743244

DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

Public Health Service

Food and Drug Administration
Washington, DC 20204

OCT 18 2000

Kent A. Croon
Regulatory Affairs Manager
Monsanto Company
700 Chesterfield Parkway North
St. Louis, Missouri 63198

Dear Dr. Croon:

This is in regard to Monsanto 's consultation with the Food and Drug Administration (FDA) (Center for Veterinary Medicine and Center for Food Safety and Applied Nutrition) on its genetically modified Roundup Ready® NK603 corn. According to Monsanto , this new line is modified for herbicide tolerance through the expression of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene (EPSPS) isolated from *Agrobacterium tumefaciens* sp. CP4. The CP4 EPSPS gene encodes the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, which confers tolerance to glyphosate (Roundup®) herbicide.

As part of bringing the consultation regarding this product to closure, Monsanto submitted a summary of its safety and nutritional assessment of the genetically modified Roundup Ready® NK603 corn on February 28, 2000. This communication informed the FDA of the steps taken by Monsanto to ensure that this product complies with the legal and regulatory requirements that fall within FDA's jurisdiction. Based on the safety and nutritional assessment Monsanto has conducted, it is our understanding that Monsanto has concluded that the Roundup Ready® NK603 corn grain and forage derived from the new variety, are not materially different in composition, safety, and other relevant parameters from corn grain and forage currently on the market and that it does not raise issues that would require premarket review or approval by FDA. All materials relevant to this notification have been placed in a file designated BNF 0071. This file will be maintained in the Office of Premarket Approval.

Based on the information Monsanto has presented to FDA, we have no further questions concerning grain and forage from the Roundup Ready® NK603 corn at this time. However, as you are aware, it is Monsanto 's continued responsibility to ensure that foods marketed by the firm are safe, wholesome, and in compliance with all applicable legal and regulatory requirements.

Sincerely yours,

Alan M. Rulis, Ph.D.
Director
Office of Premarket Approval
Center for Food Safety
and Applied Nutrition

AA048652

[Papel membretado de MONSANTO]

MONSANTO
imagine

MONSANTO COMPANY
800 North Lindbergh Blvd
St. Louis, Missouri 63167
http://www.monsanto.com

ESTADO DE MISSOURI)
)
CONDADO DE SAN LUIS)

Yo, Jill S. Martin, Notario Público en y del citado estado, certifico que el día 16 de mayo de 2008 comparé cuidadosamente la fotocopia que se adjunta a la carta emitida por la Secretaría de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos [*U.S. Department of Health and Human Services*] con fecha del día 18 de octubre del año 2000 por parte de Alan M. Rulis, Director, al Dr. Kent A. Croon con el original que ahora tengo en mi posesión. Es una copia íntegra, completa, fiel y exacta del documento que pretende reproducir.

[Firmado]_____
Notario Público

Mi Mandato Vence el: 2/8/2009

[Sello estampado que dice: JILL S. MARTIN Notario Público - Sello Notarial Estado de Missouri - Condado de St. Charles. Mi Mandato Vence el día 2 de agosto de 2009. Mandato #05743244].

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

[Papel membretado de la Secretaría de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. Servicios de Salud Pública. Dirección de Alimentos y Medicamentos. Washington DC 20204].

18 de octubre de 2000

Dr. Kent A. Croon
Director de Asuntos Regulatorios
Monsanto Company
700 Chesterfield Parkway North
St. Louis, Missouri 63198

Estimado Dr. Croon:

La presente es con relación a la consulta planteada por Monsanto ante la Dirección de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (Centro para la Medicina Veterinaria y Centro para la Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada) sobre a su maíz genéticamente modificado Roundup Ready© NK603- De acuerdo con Monsanto, esta nueva línea está modificada para tener tolerancia a los herbicidas a través de la expresión del gen de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) aislado de la *Agrobacterium tumefaciens*, sp. CP4. El gen CP4 EPSPS codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, la cual confiera tolerancia al herbicida (Roundup®) glifosato.

Como parte de llevar la consulta respecto de este producto a término, Monsanto presentó el día 28 de febrero del año 2000, un resumen de su evaluación su evaluación nutrimental y de inocuidad del maíz Roundup Ready® NK603 modificado genéticamente. Esta comunicación informaba a la FDA sobre los pasos que tomó Monsanto a fin de asegurarse que el producto cumplía con los requisitos legales y regulatorios que caen dentro de la jurisdicción de la FDA. Con base en la evaluación nutrimental y de inocuidad que ustedes han realizado, entendemos que Monsanto ha concluido que el grano de maíz Roundup Ready® NK603 y el forraje que se deriva de esta nueva variedad no son diferentes de manera significativa en su composición, inocuidad y demás parámetros relevantes del maíz que actualmente se encuentra en el mercado y que el maíz genéticamente modificado no plantea cuestiones que requieran una revisión previa a la comercialización o aprobación por parte de la FDA. Todos los materiales relevantes para la presente notificación han sido colocados en un archivo designado como BNF 007[illegible]. Este

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

archivo se conservará en la Dirección de Aprobación Previa a la Comercialización (*Office of Premarket Approval*).

Con base en la información que fue presentada por Monsanto ante la FDA, por el momento no tenemos preguntas adicionales con respecto al grano o forraje de maíz Roundup Ready® NK603. Sin embargo, como es de su conocimiento, es responsabilidad de Monsanto el asegurarse que los alimentos que comercialice la compañía sean inocuos, saludables y que cumplan con todos los requisitos legales y regulatorios que sean aplicables.

Atentamente,

[Firmado]
Dr. Alan M. Rulis
Director
Dirección de Aprobación Previa a la Comercialización
Centro para la Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada

[Código de Barras]
AA048652

****

Yo, **Fernando Orea**, Perito Traductor autorizado por el **Consejo de la Judicatura Federal** con Número de Registro **P.151-2002**, por acuerdo publicado en el **Diario Oficial** de la Federación el día **30 de noviembre del año 2007**, en el presente acto certifico que la traducción anterior del Inglés al Español que se incluye en (3) páginas de texto, es a mi leal saber y entender, fiel y completa.

México, Distrito Federal, 26 de mayo del año 2008.

Fernando Orea Mesta
Perito Traductor Autorizado por el
Consejo de la Judicatura Federal
Con Número de Registro P.151-2002
Por acuerdo publicado en el
Diario Oficial de la Federación
El día 30 de noviembre del año 2007

5) COFEPRIS- MON- ØØ6Ø3-6 (NK603)- 2002

SECRETARIA
DE SALUD

COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS
DIRECCIÓN GENERAL DE CONTROL SANITARIO DE PRODUCTOS Y SERVICIOS
DIRECCIÓN DE NORMALIZACIÓN SANITARIA
SOO/LO2/DNS/ 023405754 /02
México D.F., a 07 JUN. 2002

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.

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® 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® 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 esta 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 otorguen 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 Directora General

Biol. Aída Albuerne Piña

Ccp. Lic. Ernesto Enríquez Rubio. Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.-Leibinitz No. 20, PH, Col. Anzures, 11590, México D.F.
Ccp. Dr. Carlos Santos Burgoa. Director General de Salud Ambiental.-Mariano Escobedo No. 366, 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.
AAP/EEG/CJF/DPC

PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD PARA MAÍZ

Lineamientos para buenas prácticas de experimentación para evaluar la bioseguridad con maíces genéticamente modificados (GM).

i PROPÓSITO (Objetivo)
ii ALCANCE
iii RESPONSABILIDADES

ENFOQUE PARA EL MANEJO DEL RIESGO EN LIBERACIONES DE CAMPO EXPERIMENTALES

1. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL EXPERIMENTAL MODIFICADO POR INGENIERÍA GENÉTICA
1.1. INTRODUCCIÓN
1.2. PERSONAL
1.3. TRANSPORTE DE MATERIAL VEGETAL EXPERIMENTAL MODIFICADO POR INGENIERÍA GENÉTICA
1.3.1. Disposición final del material vegetal experimental modificado por ingeniería genética
1.3.2. Registros e informes
1.4. ALMACENAMIENTO DE MATERIALES VEGETALES EXPERIMENTALES MODIFICADOS POR INGENIERÍA GENÉTICA
1.4.1. Disposición final de vegetales modificados genéticamente
1.4.2. Registros e informes
1.5. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE LIBERACIÓN ACCIDENTAL

2. MANEJO DEL LUGAR DEL ENSAYO.
2.1. INTRODUCCIÓN
2.2. PERSONAL
2.3. SIEMBRA DEL ENSAYO
2.3.1. Selección del lugar del ensayo
2.3.2. Demarcación del lugar del ensayo
2.3.3. Mapa del lugar del ensayo
2.3.4. Limpieza del equipo de campo
2.4. AISLAMIENTO REPRODUCTIVO DE LOS ENSAYOS
2.4.1. Biología reproductiva de la especie en experimentación
2.4.2. Aislamiento espacial
2.4.3. Aislamiento temporal
2.4.4. Bordo
2.5. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL
2.6. REGISTROS E INFORMES

3. COSECHA Y DISPOSICIÓN FINAL DE MATERIALES DE ENSAYOS DE CAMPO CONFINADOS
3.2. RETENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL COSECHADO DE LOS ENSAYOS DE CAMPO EXPERIMENTALES
3.3. LIMPIEZA DEL EQUIPO
3.4. FINALIZACIÓN ANTICIPADA DE LOS ENSAYOS
3.5. DISPOSICIÓN FINAL DE MATERIAL VEGETAL DEL ENSAYO
3.6. TRANSPORTE DE MATERIALES COSECHADOS DESDE EL SITIO DEL ENSAYO
3.7. MONITOREO DE LA COSECHA DEL ENSAYO
3.8. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL

3.9. REGISTROS E INFORMES

4. MANEJO DEL LUGAR DEL ENSAYO DESPUÉS DE LA COSECHA
4.1. INTRODUCCIÓN
4.2. RESTRICCIONES POST COSECHA
4.3 MONITOREO POSTCOSECHA DEL LUGAR DEL ENSAYO
4.4. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE UNA LIBERACIÓN ACCIDENTAL
4.5. REGISTROS E INFORMES

Lineamientos para buenas prácticas de experimentación para evaluar la bioseguridad con maíces genéticamente modificados (GM).

El objetivo principal de este documento es el de proveer lineamientos de las mejores prácticas y recomendaciones generales para el transporte, manejo, evaluación y disposición de materiales GM. Donde, cada ensayo en particular que utilice materiales GM se implementaran basados en un protocolo especifico para cada ensayo.

La aplicación de los principios del manejo de riesgos, 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 que definen los experimentos de campo estarán bajo supervisión de investigadores especialistas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y de Universidades e Institutos de Investigación.

Los protocolos de bioseguridad son 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 e interacciones ecológicas en comparación con material convencional de fondo genético común en diferentes ambientes dentro de la República 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, o ambas características) 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.

i.- 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 mitigación 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:

- Proveer lineamientos, metodologías y mejores prácticas para el manejo responsable de los materiales, ejecución eficiente y uniforme de los ensayos y de manera que cumpla con los términos y condiciones acordados en la autorización para la realización de ensayos experimentales de campo con maíces GM.

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

ii.- ALCANCE

Los lineamientos, mejores prácticas y metodologías descritas en este documento serán seguidas por todas las personas involucradas en la planeación, mantenimiento, dirección y ejecución del proyecto.

iii.- RESPONSABILIDADES

La responsabilidad sobre la conducción apegada a los requerimientos del Permiso de liberación corresponden al solicitante.

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 previsiones 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:

1. prevenir la diseminación en el ambiente de los nuevos genes a través del polen o de las semillas;

2. prevenir la persistencia de plantas transgénicas o de su progenie en el ambiente; y

3. 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.

Los puntos de control más crítico en el manejo adecuado de los ensayos de campo experimentales son:

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.
7. Implementar las medidas adecuadas y oportunas en casos de incidentes (liberaciones accidentales) con el uso y manejo del maíz GM.

Al igual que en programas de control de calidad 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 presenta los procedimientos operativos estándar 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, 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.

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 empacados 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, número de tubérculos)
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

☐ Semilla ☐ Esqueje/vástago ☐ Transplante ☐ Tubérculo ☐ 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™ 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 con sellado térmico, 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. En el Apéndice 1 (Registro de Transporte) se presenta el procedimiento operacional normalizado para el transporte de material vegetal experimental genéticamente modificado que tiene en cuenta estas sugerencias.

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, un área apropiada de almacenamiento es aquella en la que el material vegetal pueda guardarse en forma separado 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.

ESTE DEPÓSITO CONTIENE MATERIAL VEGETAL TRANSGÉNICO EXPERIMENTAL

Nombre o código de la instalación:
Nombre o identificación del edificio:
Número o descripción de la sala:

EL ACCESO A ESTE ÁREA DE ALMACENAJE ESTÁ LIMITADO AL PERSONAL DESIGNADO POR EL RESPONSABLE TÉCNICO

Nombre del Responsable técnico:
Número de oficina:
Teléfono:

EN CASO DE EMERGENCIA O DAÑO AL ÁREA DE ALMACENAJE, CONTACTE INMEDIATAMENTE AL RESPONSABLE TÉCNICO

Figura 2. Ejemplo de etiqueta de identificación para ingreso a 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 sub-muestras 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. En el Apéndice 2 (Registro de Inspección de Almacén e Inventario) se presenta el procedimiento operacional normalizado para el almacenamiento de material vegetal experimental genéticamente modificado que tiene en cuenta estas sugerencias.

1.5. ACCIONES CORRECTIVAS EN EL CASO DE 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. En el Apéndice 8 (Registro de Acción Correctiva) se presenta el formato para el Registro de Acción Correctiva.

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 repita.

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, monitoreo del lugar y restricciones en el uso del suelo luego de la cosecha. 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

La siembra de ensayos con materiales genéticamente modificados son similares a la siembra de materiales convencionales, con la excepción de que se debe de verificar la información del permiso, predio y materiales a sembrar. Además de llevar registros estrictos de las actividades y de las condiciones de siembra. Específicamente, antes de efectuar la siembra se debe verificar:

- la cobertura del predio en el permiso de liberación,
- la ubicación del predio GPS ANTES de sembrar.
- verificar el aislamiento respecto a otros maíces y materiales receptivos
- verificar que los materiales estén en orden de siembra planeado y de acuerdo al protocolo del ensayo
- verificar que las tolvas de siembra están completamente limpias antes de entrar al predio a sembrar

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, realísticamente, las posibilidades de obtener y 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 señalizar sus cuatro esquinas con marcadores semi-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 (m2 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.

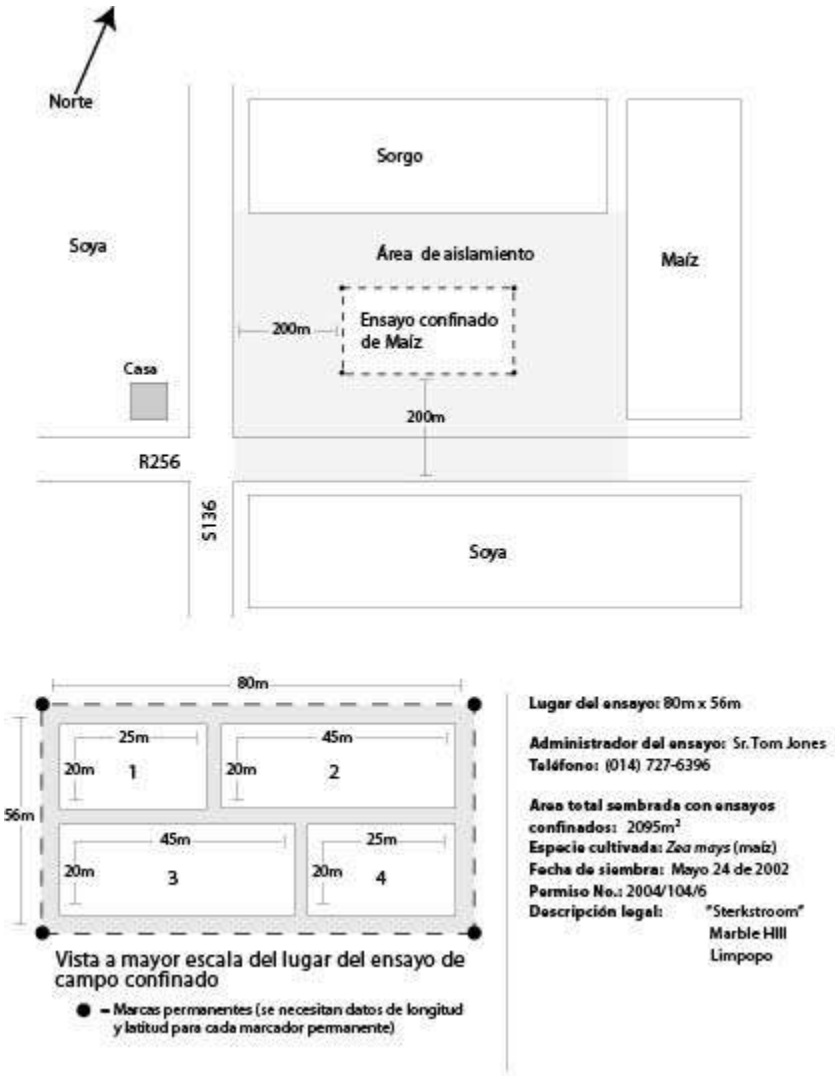


Figura 3. Ejemplo de un plano de lugar para el establecimiento de un ensayo de campo experimental.

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, aspiradoras de aire o con agua a alta presión. En caso de usar aspiradoras, el material colectado durante la limpieza deberá ser desechado como material genéticamente modificado.

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, deberá ser tratado como material genéticamente modificado y someterlo a tratamientos que lo hagan inviable o destrucción; 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.

2.4.2. 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 (ver Apéndice 3b Registro de Aislamiento Espacial).

2.4.3. 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 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.

2.4.4. 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. En el Apéndice 3 se presenta el procedimiento operacional normalizado para el registro de aislamiento de los surcos de bordo.

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.

2.5. 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. En el Apéndice 8 se presenta el formato para el Registro de Acción Correctiva.

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.

2.6. 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 para garantizar que el ensayo continúe confinado durante el ciclo de crecimiento del cultivo. El programa permitirá la rápida detección de cualquier problema concerniente al aislamiento reproductivo para así adoptar acciones correctivas en forma rápida de manera tal de resolver las potenciales situaciones de incumplimiento. Adicionalmente, cuando el aislamiento reproductivo se haya realizado en forma temporal, con remoción de inflorescencias o mediante borduras, las inspecciones tanto en el ensayo como en los campos adyacentes, se efectuarán con mayor frecuencia a partir del momento de aparición de las inflorescencias y hasta que termine la floración de las plantas del ensayo.

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. La parte autorizada debe obtener un permiso de la autoridad regulatoria para conservar las semillas cosechadas y/o los tejidos vegetales.

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. En el Apéndice 5 (Registro de Destrucción Temprana del Cultivo) se presenta el procedimiento operacional normalizado para la destrucción temprana del cultivo.

3.5. DISPOSICIÓN FINAL DE 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.

En el Apéndice 6 (Registro de Cosecha/Terminación) se presenta el procedimiento operacional normalizado para el registro de cosecha/terminación

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. En el Apéndice 8 se presenta un ejemplo de un Registro de Acción Correctiva. 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 en el periodo post cosecha durante uno o más años, 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. Cuando el aislamiento reproductivo no ha sido respetado, el monitoreo y la disposición final de las plantas prohibidas también debe efectuarse en el área de aislamiento correspondiente, alrededor del ensayo.

La autoridad regulatoria podrá exigir un plazo adicional de restricción para el uso postcosecha de la tierra, en caso que se permita que las plantas voluntarias provenientes del ensayo (u otras especies relacionadas) completen su período de antesis durante la etapa de post cosecha. El polen diseminado por las plantas voluntarias podrá llevar a la persistencia del material transgénico a través de la producción de una progenie híbrida cuando individuos de la misma especie o de especies relacionadas están presentes en el área que rodea el lugar donde tuvo lugar el ensayo.

El lugar del ensayo:

1. Puede ser sembrado con el mismo evento o con otro evento transgénico de la misma especie. El lugar del ensayo estará sujeto a las mismas regulaciones y/o condiciones de permiso que el ensayo de campo confinado realizado previamente (a menos que la autoridad regulatoria añada otras condiciones). Las restricciones de uso posteriores a la cosecha serán entonces implementadas luego de la cosecha del ensayo confinado que tuvo lugar en forma subsiguiente.
2. En que se realizó el ensayo puede ser sembrado con una variedad convencional de la misma especie que el material transgénico en experimentación. Tal como en el caso anterior, el lugar del ensayo estará sujeto a las mismas regulaciones y/o condiciones de permiso que el ensayo de campo confinado realizado previamente (a menos que la autoridad regulatoria añada otras condiciones). Todo el material vegetal convencional cosechado durante el periodo de restricciones post cosecha tendrá que ser manipulado de la misma manera que el material vegetal experimental, debido a la presencia potencial de plantas adventicias del material experimental (pues el monitoreo efectivo de las especies voluntarias no será posible). Las restricciones de uso posteriores a la cosecha serán entonces implementadas luego de la cosecha del ensayo confinado, efectuado posteriormente.

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.

En el Apéndice 7 registro de Inspección Postcosecha se presenta el procedimiento operacional normalizado para el registro de inspección postcosecha.

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. En el Apéndice 8 se presenta un ejemplo de un Registro de Acción Correctiva. 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.

Se anexan los formatos para cada una de las acciones descritas.

REGISTRO DE TRANSPORTE

NÚMERO DE EMBARQUE

INSTRUCCIONES

- Este Registro de Transporte debe llenarse para cada embarque de artículos regulados y puede servir como guía de los materiales en tránsito.
- Para el embarque de un sólo evento experimental transgénico, proporcionar en esta página la información de Identificación del Evento Transgénico. Para embarques de múltiples eventos, llenar y anexar una o más copias del inventario en la página 2.
- Este Registro de Transporte debe enviarse vía fax o correo electrónico por el proveedor al destinatario para recibir la semilla y a la Parte Autorizada con anticipación al embarque.
- En caso de una liberación accidental durante el embarque, deberá notificarse inmediatamente a la Parte Autorizada por teléfono o por fax. En la forma de Registro de Acción Correctiva deberá registrarse el incidente y cualquier acción correctiva realizada.

TRANSPORTISTA Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	**DESTINATARIO** Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)
Compañía	Departamento		Compañía	Departamento	
Dirección			Dirección		
Ciudad	Estado	Código Postal	Ciudad	Estado	Código Postal
Teléfono	Fax	E-mail	Teléfono	Fax	E-mail

VERIFICACIÓN PRE-EMBARQUE Medio de Transporte ☐ Tren ☐ Carretera☐ Aire ☐ Barco☐ Otros, especificar	IDENTIFICACIÓN DEL EVENTO TRANSGÉNICO Número de Identificación del Usuario Número de Permiso
Nombre del Transportista / Teléfono	Especie Vegetal / Especificar Cantidad Exacta de Material Embarcado
Contenedor Primario del Embarque- Sellado ☐Bolsa de Plástico ☐Sobre de papel manila grueso con folde de seguridad ☐ Bolsa de tela o tejida ☐Caja de Cartón ☐Otros (detallar abajo)	Forma de Material ☐Injertos de yema ☐Brotes ☐Semillas ☐Planta completa ☐Trasplantes ☐Rizomas ☐Tubérculos Identificación de Cualquier Tratamiento a la Semilla u Otro Tratamiento al Material
Tipo de Contenedor Secundario del Embarque Tipo de Contenedor Externo del Embarque (tercera capa)	**PARA SER LLENADO POR EL DESTINATARIO**
Condición de los Contenedores de Embarque Nuevo Usado Sanitizado (detallar a continuación) Método de Sanitización: ¿Se confirmó que los Contenedores están libres de Material Vegetal Antes de Cargarlos? ☐Si ☐No	RECEPCIÓN DE EMBARQUE Todo el Inventario Verificado y Completo ☐Si ☐No Recepción de Todos los Documentos Anexos ☐Si ☐No Condición de los Contenedores de Embarque Contenedor Primario ☐ Intacto ☐ Violado Contenedor Secundario ☐ Intacto ☐ Violado Contenedor Externo (tercera capa) ☐ Intacto ☐ Violado

REGISTRO DE TRANSPORTE

Documentación Anexa ☐Permiso de Importación ☐Certificado Fitosanitario ☐Certificado de Origen ☐Tratamiento de semillas, MSDS* si las semillas se trataron ☐Permiso de Movilización o de Liberación y Movilización ☐Copia de las Condiciones del Permiso ☐Otros (abajo)	Otros Detalles sobre la Condición de los Contenedores de Embarque o Documentación
VERIFICACIóN DEL EMBARQUE Firma del Expedidor _____Fecha de Embarque	VERIFICACIóN DE RECEPCIÓN Firma del Destinatario _____Fecha de Recepción

LISTA DEL INVENTARIO DE EVENTOS TRANSGÉNICOS (O copias anexas de la lista detallada de materiales del embarque, por ejemplo, Recibo de Transferencia de Semilla de Variedad)

1. Número de artículo	Identificador Único o Nombre del Evento	No. de Permiso.	Especificar Cantidad Exacta de Material Embarcado
Forma del Material ☐Injertos de yema ☐Tubérculos ☐Brotes ☐Rizomas ☐Semillas ☐Trasplantes ☐Plantas Completa	Especie Vegetal		Identificar Cualquier Tratamiento a la Semilla u Otro Tratamiento del Material
2. Número de artículo	Identificador Único o Nombre del Evento	No. de Permiso.	Especificar Cantidad Exacta de Material Embarcado
Forma del Material ☐Injertos de yema ☐Tubérculos ☐Brotes ☐Rizomas ☐Semillas ☐Trasplantes ☐Plantas Completa	Especie Vegetal		Identificar Cualquier Tratamiento a la Semilla u Otro Tratamiento del Material
3. Número de artículo	Identificador Único o Nombre del Evento	No. de Permiso.	Especificar Cantidad Exacta de Material Embarcado
Forma del Material ☐Injertos de yema ☐Tubérculos ☐Brotes ☐Rizomas ☐Semillas ☐Trasplantes ☐Plantas Completa	Especie Vegetal		Identificar Cualquier Tratamiento a la Semilla u Otro Tratamiento del Material
4. Número de artículo	Identificador Único o Nombre del Evento	No. de Permiso.	Especificar Cantidad Exacta de Material Embarcado
Forma del Material ☐Injertos de yema ☐Tubérculos ☐Brotes ☐Rizomas ☐Semillas ☐Trasplantes ☐Plantas Completa	Especie Vegetal		Identificar Cualquier Tratamiento a la Semilla u Otro Tratamiento del Material
5. Número de artículo	Identificador Único o Nombre del Evento	No. de Permiso.	Especificar Cantidad Exacta de Material Embarcado
Forma del Material ☐Injertos de yema ☐Tubérculos ☐Brotes ☐Rizomas ☐Semillas ☐Trasplantes ☐Plantas Completa	Especie Vegetal		Identificar Cualquier Tratamiento a la Semilla u Otro Tratamiento del Material

*Hoja de Seguridad de Materiales (MSDS, por sus siglas en ingles)

REGISTRO DE INSPECCIÓN DE ALMACÉN E INVENTARIO

INSTRUCCIONES

- Este Registro de Inspección de Almacén e Inventario se divide en dos partes: Inspección de Almacén y Cambio en el Inventario.
- El Gerente de la Instalación debe llenar la sección de Inspección de Almacén UNA VEZ CADA CUATRO (4) SEMANAS para garantizar que se mantienen las condiciones de almacenamiento con el fin de que no ocurran eventos no intencionados de liberación de transgénicos.
- Debe agregarse una entrada al Cambio de Inventario cada vez que se añada o se retire cualquier cantidad de evento transgénico del almacén para transporte fuera de la instalación sin llenar un Registro de Transporte.
- El Gerente de la Instalación deberá conservar el presente Registro de Inspección de Almacén e Inventario. Cuando se llene completamente la hoja de Inspección de Almacén o bien la hoja de Cambio en el Inventario, el Gerente de la Instalación la intercambiará por una página nueva y conservara la forma llena.
- En el caso de una liberación accidental durante el almacenamiento, la parte Autorizada debe ser notificada inmediatamente por teléfono y por fax. El incidente y cualquier acción correctiva realizada deben registrarse en la forma de Registro de Acción Correctiva.

GERENTE DE LA INSTALACIÓN Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	Compañía	Departamento

Dirección	Ciudad	Estado	Código Postal

Teléfono	Fax	Email

INSTALACIONES PARA ALMACENAMIENTO Nombre de Identificación del Edificio	Número de Habitación o Descripción	Dirección
Ciudad	**Estado**	**Código Postal**

INSPECCIÓN DE ALMACÉN

Fecha de Inspección	Área de Almacén Segura ☐Si ☐ No	Área de Almacén Limpia y Libre de Cualquier desperdicio o desecho vegetal	Área de Almacén Etiquetada Claramente ☐Si ☐ No	Registros Mensuales de Inspección de Almacén Disponibles ☐Si ☐ No	Firma del Gerente de la Instalación _____
Fecha de Inspección	Área de Almacén Segura ☐Si ☐ No	Área de Almacén Limpia y Libre de Cualquier desperdicio o desecho vegetal	Área de Almacén Etiquetada Claramente ☐Si ☐ No	Registros Mensuales de Inspección de Almacén Disponibles ☐Si ☐ No	Firma del Gerente de la Instalación _____
Fecha de Inspección	Área de Almacén Segura ☐Si ☐ No	Área de Almacén Limpia y Libre de Cualquier desperdicio o desecho vegetal	Área de Almacén Etiquetada Claramente ☐Si ☐ No	Registros Mensuales de Inspección de Almacén Disponibles ☐Si ☐ No	Firma del Gerente de la Instalación _____
Fecha de Inspección	Área de Almacén Segura ☐Si ☐ No	Área de Almacén Limpia y Libre de Cualquier desperdicio o desecho vegetal	Área de Almacén Etiquetada Claramente ☐Si ☐ No	Registros Mensuales de Inspección de Almacén Disponibles ☐Si ☐ No	Firma del Gerente de la Instalación _____
Fecha de Inspección	Área de Almacén Segura ☐Si ☐ No	Área de Almacén Limpia y Libre de Cualquier desperdicio o desecho vegetal	Área de Almacén Etiquetada Claramente ☐Si ☐ No	Registros Mensuales de Inspección de Almacén Disponibles ☐Si ☐ No	Firma del Gerente de la Instalación _____

REGISTRO DE INSPECCIÓN DE ALMACÉN E INVENTARIO

CAMBIO EN EL INVENTARIO
INGRESO O RETIRO DE MATERIAL DEL INVENTARIO

☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente
☐ Adición ☐ Retiro	Fecha	Nombre de Persona Autorizada	Firma de Persona Autorizada	
Número de artículo	identificador Único o Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Adicionada o Retirada	Cantidad Remanente

REGISTRO DE SIEMBRA

INSTRUCCIONES

- Este Registro de Siembra debe llenarse para documentar la siembra de todos los artículos regulados en el campo del sitio de estudio.
- Úsense los siguientes códigos de dos letras para designar el método de destrucción para el exceso de material de siembra: BU -- quema o incineración CT – Incorporación del cultivo a la tierra dentro del sitio regulado
- Después de que el Gerente del Estudio termine de llenar este registro, se debe enviar una copia a la Parte Autorizada.

GERENTE DEL ESTUDIO Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	Compañía	Departamento

Dirección	Ciudad	Estado	Código Postal

Teléfono	Fax	Email

SITIO DE ESTUDIO Código de Localización del Sitio	Tamaño del Sitio de Estudio (m x m)	No. de Estudios en este Sitio	Localización Legal o Descriptiva del Terreno del Sitio de Estudio o Coordenadas GPS Únicas

TRANSPORTE DEL MATERIAL REGULADO

¿Se anexa el Registro de Transporte de Todo el Material Embarcado al Sitio de Estudio? ☐ Si ☐ No Número de Embarque	¿Se Embarcó Algún Material Vegetal desde el Sitio de Estudio o Después de la Siembra? ☐ Si ☐ No Si sí, Número de Embarque

MAQUINARIA PARA PLANTACIÓN Y SIEMBRA

¿Se Inspeccionó Toda la Maquinaria y se Confirmó que Estuviera Libre de Material Vegetal Antes de Entrar en el Sitio de Estudio? ☐ Sí ☐ No	Indicar Como se Limpió en el Sitio de Estudio la Maquinaria Usada para Sembrar, Plantar o Cultivar ☐ Aspirado ☐ Aire Comprimido ☐ Agua a Alta Presión ☐ Otro, abajo

MÉTODO DO AISLAMIENTO REPRODUCIVO

☐ Aislamiento Espacial ☐ Destrucción Temprana de Cosecha ☐ Bordos

HOJA DE DATOS PARA REGISTRAR INFORMACIÓN DE SIEMBRA

Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Sembrada	Cantidad en Exceso Destruida (kg/No. plantas)	Método de Destrucción	Fecha de Siembra
Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Sembrada	Cantidad en Exceso Destruida (kg/No. plantas)	Método de Destrucción	Fecha de Siembra
Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Sembrada	Cantidad en Exceso Destruida (kg/No. plantas)	Método de Destrucción	Fecha de Siembra

VERIFICACIÓN

Las acciones correctivas detalladas en este reporte se llevaron a cabo en apego a los procedimientos operativos estándar y a las regulaciones aplicables que rigen el transporte, almacenamiento y pruebas de campo de materiales vegetales experimentales modificados genéticamente.

_____ Fecha_____

Mediante mi firma hago constar que a mi leal saber y entender la información aquí registrada es veraz y completa

REGISTRO DE AISLAMIENTO ESPACIAL

INSTRUCCIONES

- La distancia de aislamiento espacial debe inspeccionarse no menos de UNA VEZ CADA 4 (CUATRO) SEMANAS durante la temporada de crecimiento para detectar la presencia de plantas prohibidas.
- Si se permite que alguna planta prohibida dentro de la distancia de aislamiento inicie el periodo de antesis, habrá ocurrido potencialmente una violación del aislamiento reproductivo.
- Este registro de Aislamiento Espacial debe usarse para registrar la inspección, incluyendo entresacado cuando sea necesario. Las inspecciones las debe efectuar el Gerente del Estudio o una persona autorizada por el Gerente del Estudio.
- El Gerente del Estudio debe conservar este Registro de Aislamiento Espacial.
- En el caso de una violación del aislamiento reproductivo, se debe notificar inmediatamente a la Parte Autorizada por teléfono y por fax. El incidente y cualquier acción correctiva realizada se debe registrar en la Forma de Registro de Acción Correctiva.

GERENTE DEL ESTUDIO Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	Compañía	Departamento

Dirección	Ciudad	Estado	Código Postal

Teléfono	Fax	Email

SITIO DE ESTUDIO Código de Localización del Sitio	Tamaño del Sitio de Estudio (m x m)	No. de Estudios en este Sitio	Localización Legal o Descriptiva del Terreno del Sitio de Estudio o Coordenadas GPS Únicas

EVENTO TRANSGÉNICO BAJO ESTUDIO

Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra

HOJA DE DATOS PARA REGISTRO DE INSPECCIONES POR LA PRESENCIA DE PLANTAS PROHIBIDAS

Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector

REGISTRO DE AISLAMIENTO ESPACIAL

Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector

COMENTARIOS ADICIONALES Y OBSERVACIONES

VERIFICACIÓN

Las acciones correctivas detalladas en este reporte se llevaron a cabo en apego a los procedimientos operativos estándar y a las regulaciones aplicables que rigen el transporte, almacenamiento y pruebas de campo de materiales vegetales experimentales modificados genéticamente.

_____ Fecha_____

Mediante mi firma hago constar que a mi leal saber y entender la información aquí registrada es veraz y completa

REGISTRO DEL BORDO DE AISLAMIENTO

INSTRUCCIONES

- Los estudios deben inspeccionarse no menos de UNA VEZ CADA 4 (CUATRO) SEMANAS, antes de que ocurra la inflorescencia. Los estudios deben inspeccionarse diariamente después de la inflorescencia y hasta que TODOS los eventos transgénicos hayan concluido la antesis.
- Si cualquier evento transgénico empieza antesis antes que las plantas de los surcos del bordo, ó termina antésis después que las plantas en los surcos de bordo terminen esta etapa, ó si hay espacios físicos significativos en las plantas de los surcos de bordo, durante la emisión de polen (antesis), habrá ocurrido una violación del aislamiento reproductivo.
- Debe usarse el Registro del Bordo de Aislamiento para registrar actividades de inspección. Las inspecciones deberá realizarlas el Encargado del Estudio o una persona autorizada por el Encargado del Estudio.
- El Encargado del Estudio debe conservar este Registro del Bordo de Aislamiento.

ENCARGADO DEL ESTUDIO Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	Compañía	Departamento

Dirección	Ciudad	Estado	Código Postal

Teléfono	Fax	E-mail

SITIO DE ESTUDIO Código de Localización del Sitio	Tamaño del Sitio de Estudio (m x m)	No. de Estudios en este Sitio	Localización Legal o Descriptiva del Terreno del Sitio de Estudio o Coordenadas GPS Únicas

EVENTO TRANSGÉNICO BAJO ESTUDIO

Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Número de Permiso	Fecha de Siembra

HOJA DE DATOS PARA REGISTRO DE INSPECCIONES PARA LA PRESENCIA DE PLANTAS PROHIBIDAS

Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector

REGISTRO DEL BORDO DE AISLAMIENTO

Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector

COMENTARIOS ADICIONALES Y OBSERVACIONES

VERIFICACIÓN DEL ENCARGADO DEL EXPERIEMNTO

Las acciones detalladas en este reporte se llevaron a cabo en apego a los procedimientos operativos estándar y a las regulaciones aplicables que rigen el transporte, almacenamiento y pruebas de campo de materiales vegetales experimentales modificados genéticamente.

_____ Fecha_____

Mediante mi firma hago constar que a mi leal saber y entender la información aquí registrada es veraz y completa

REGISTRO DE COSECHA/TERMINACIÓN

INSTRUCCIONES

- Este Registro de Cosecha/Terminación debe llenarse después de la cosecha o terminación temprana y eliminación del material vegetal en el sitio de estudio, y debe documentarse el método de cosecha, la(s) fecha(s) de cosecha y el destino de todos los materiales cosechados y de cualquier material vegetal residual remanente en el sitio de estudio.
- El Registro de Cosecha/Terminación debe conservarlo el Encargado del Estudio y se debe enviar una copia a la Parte Autorizada dentro de los 5 (CINCO) DÍAS POSTERIORES A LA COSECHA/TERMINACIÓN del estudio.
- En el caso de una violación del aislamiento reproductivo, se debe notificar inmediatamente por teléfono y por fax a la Parte Autorizada. Se debe registrar el incidente y cualquier acción correctiva realizada en la Forma de Registro de Acción Correctiva.

ENCARGADO DEL ESTUDIO Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	Compañía	Departamento

Dirección	Ciudad	Estado	Código Postal

Teléfono	Fax	E-mail

SITIO DE ESTUDIO Código de Localización del Sitio	Tamaño del Sitio de Estudio (m x m)	No. de Estudios en este Sitio	Localización Legal o Descriptiva del Terreno del Sitio de Estudio o Coordenadas GPS Únicas

Especies del Evento Transgénico
☐ Algodón ☐ Maíz ☐ Soya ☐ Colza ☐ Yuca
☐ Arroz ☐ Papa ☐ Camote ☐Otro _____

Distancia al Campo Más Cercano de Cultivo de Especies Sexualmente Compatibles (m)	Distancia al Cultivo Comercial de Cualquier Tipo Más Cercano (m)	Esta el área de aislamiento controlada por el que maneja el ensayo?☐ Si ☐ No

Razón de Terminación	En el caso de terminación temprana, ¿fue debido a un problema de falta de cumplimiento?
☐ Terminación Temprana del Estudio ☐ Fin de la Cosecha de Temporada	☐ Si ☐ No

MAQUINARIA DE COSECHA

Método de cosecha utilizado	Maquinaria Utilizada para Cosechar
☐ Desecado y cosechadora combinada ☐ Segadora y Cosechadora Combinada ☐ a Mano ☐ Otra	☐ Cosechadora Combinada Grande ☐ Cosechadora Combinada Pequeña ☐ Otra
¿Se Inspeccionó Toda la Maquinaria y se Confirmó que Estuviera Libre de Material Vegetal Antes de Entrar en el Sitio de Estudio? ☐ Sí ☐ No	Indicar Como se Limpió en el Sitio de Estudio la Maquinaria Usada para Sembrar, Plantar o Cultivar ☐ Aspirado ☐ Aire Comprimido ☐ Agua a Alta Presión ☐ Otro, abajo

DESTRUCCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EN EL SITIO

Indicar el Método de Destrucción del Material de Articulo Regulado en el Sitio de Estudio
☐ Desecado ☐ Vaporización ☐ Incineración ☐ Tratamiento Químico ☐ Rastra de Discos ☐ Arado ☐ Entierro Profundo
☐ Otro

HOJA DE DATOS PARA REGISTRO DE COSECHA Y DESECHO

Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Cosechada (kg)	Cantidad Retenida/Almacenada (kg)	Fecha de Cosecha
Eventos Transgénicos Embarcados desde el Sitio ☐ Si ☐ No	Embarque No.	Eventos Transgenicos Almacenados en el Sitio ☐ Si ☐ No	Domicilio y Número Telefónico del Gerente de Almacén de la Instalación	Tipo de Material Retenido ☐ Granos/Semillas ☐ Material Vegetal ☐Plantas Completas

REGISTRO DE COSECHA/TERMINACIÓN

Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Cosechada (kg)	Cantidad Retenida/Almacenada (kg)	Fecha de Cosecha
Eventos Transgénicos Embarcados desde el Sitio ☐ Si ☐ No	Embarque No.	Eventos Transgenicos Almacenados en el Sitio ☐ Si ☐ No	Domicilio y Número Telefónico del Gerente de Almacén de la Instalación	Tipo de Material Retenido ☐ Granos/Semillas ☐ Material Vegetal ☐Plantas Completas
Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Cosechada (kg)	Cantidad Retenida/Almacenada (kg)	Fecha de Cosecha
Eventos Transgénicos Embarcados desde el Sitio ☐ Si ☐ No	Embarque No.	Eventos Transgenicos Almacenados en el Sitio ☐ Si ☐ No	Domicilio y Número Telefónico del Gerente de Almacén de la Instalación	Tipo de Material Retenido ☐ Granos/Semillas ☐ Material Vegetal ☐Plantas Completas
Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Cosechada (kg)	Cantidad Retenida/Almacenada (kg)	Fecha de Cosecha
Eventos Transgénicos Embarcados desde el Sitio ☐ Si ☐ No	Embarque No.	Eventos Transgenicos Almacenados en el Sitio ☐ Si ☐ No	Domicilio y Número Telefónico del Gerente de Almacén de la Instalación	Tipo de Material Retenido ☐ Granos/Semillas ☐ Material Vegetal ☐Plantas Completas
Código de Referencia del Usuario para el Nombre del Evento	Número de Permiso	Cantidad Cosechada (kg)	Cantidad Retenida/Almacenada (kg)	Fecha de Cosecha
Eventos Transgénicos Embarcados desde el Sitio ☐ Si ☐ No	Embarque No.	Eventos Transgenicos Almacenados en el Sitio ☐ Si ☐ No	Domicilio y Número Telefónico del Gerente de Almacén de la Instalación	Tipo de Material Retenido ☐ Granos/Semillas ☐ Material Vegetal ☐Plantas Completas

COMENTARIOS ADICIONALES Y OBSERVACIONES

COMENTARIOS ADICIONALES Y OBSERVACIONES

VERIFICACIÓNDEL ENCARGADO DEL EXPERIMENTO

Las acciones correctivas detalladas en este reporte se llevaron a cabo en apego a los procedimientos operativos estándar y a las regulaciones aplicables que rigen el transporte, almacenamiento y pruebas de campo de materiales vegetales experimentales modificados genéticamente.

Firma del encargado del experimento

_____ Fecha_____

Mediante mi firma hago constar que a mi leal saber y entender la información aquí registrada es veraz y completa.

REGISTRO DE INSPECCIÓN POSCOSECHA

INSTRUCCIONES

- Los sitios de estudio deben inspeccionarse para detectar la presencia de plantas prohibidas al menos UNA VEZ CADA 4 (CUATRO) SEMANAS durante la temporada de crecimiento para la cual estén vigentes las restricciones poscosecha. El periodo de restricciones poscosecha comienza en la fecha de terminación del estudio, la cual es normalmente la fecha de cosecha.
- Si ocurre una violación al aislamiento reproductivo durante la ejecución del estudio, deben aplicarse al sitio de estudio **Y** a la distancia de aislamiento espacial las restricciones poscosecha, incluyendo los requerimientos de inspección por plantas prohibidas.
- El Encargado del Estudio debe conservar el registro de Inspección Poscosecha. Una vez llenado, se debe enviar una copia firmada del Registro de Inspección Poscosecha a la Parte Autorizada dentro de los 5 (CINCO) DÍAS HÁBILES posteriores a la terminación de todas las observaciones. En caso de una violación del aislamiento reproductivo, debe notificarse inmediatamente por teléfono y por fax a la Parte Autorizada. El incidente y cualquier acción correctiva deben registrarse en la Forma de Registro de Acción Correctiva.

ENCARGADO DEL ESTUDIO Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	Compañía	Departamento

Dirección	Ciudad	Estado	Código Postal

Teléfono	Fax	Email

SITIO DE ESTUDIO Código de Localización del Sitio	Tamaño del Sitio de Estudio (m x m)	No. de Estudios en este Sitio	Localización Legal o Descriptiva del Terreno del Sitio de Estudio o Coordenadas GPS Únicas

Especies del Evento Transgénico
☐ Algodón ☐ Maíz ☐ Soya ☐ Colza ☐ Yuca
☐ Arroz ☐ Papa ☐ Camote ☐Otro _____

Distancia al Campo Más Cercano de Cultivo de Especies Sexualmente Compatibles (m)	Distancia al Cultivo Comercial de Cualquier Tipo Más Cercano (m)	Esta el área de aislamiento controlada por el que maneja el ensayo? ☐ Si ☐ No
Área bajo restricciones Poscosecha ☐ Área de Estudio Únicamente ☐ Zona de Aislamiento	Distancia de Aislamiento (m)	Año poscosecha ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

EVENTOS TRANSGÉNICOS PREVIOS EN EL SITIO DE ESTUDIO

Código de Referencia / Nombre del Evento	Numero de Permiso	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Permiso No.	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Permiso No.	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Permiso No.	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Permiso No.	Fecha de Siembra
Código de Referencia / Nombre del Evento	Permiso No.	Fecha de Siembra

HOJA DE DATOS PARA REGISTRO DE INSPECCIONES POR LA PRESENCIA DE PLANTAS PROHIBIDAS

Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector

REGISTRO DE INSPECCIÓN POSCOSECHA

Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector
Fecha de Inspección	¿Plantas Prohibidas Presentes? ☐ Si ☐ No	Etapa de Crecimiento de Cualesquier Plantas Prohibidas	Método de Destrucción del Material Vegetal	Comentarios Adicionales y Observaciones	Iniciales del Inspector

COMENTARIOS ADICIONALES Y OBSERVACIONES

VERIFICACIÓN DE LOS ENCARGADOS DEL EXPERIMENTO

Las acciones correctivas detalladas en este reporte se llevaron a cabo en apego a los procedimientos operativos estándar y a las regulaciones aplicables que rigen el transporte, almacenamiento y pruebas de campo de materiales vegetales experimentales modificados genéticamente.

Firma del encargado del experimento

_____ Fecha_____

Mediante mi firma hago constar que a mi leal saber y entender la información aquí registrada es veraz y completa

REGISTRO DE ACCIÓN CORRECTIVA

INSTRUCCIONES

- El Registro de Acción correctiva se usa para documentar todas las acciones correctivas llevadas a cabo para mitigar o resolver una situación que implique la liberación accidental de un evento transgénico experimental durante el transporte, almacenamiento o cosecha, o durante el periodo poscosecha, o cualquier violación del aislamiento reproductivo durante las pruebas de campo de un evento transgénico experimental.
- Debe enviarse por fax a la Parte Autorizada una copia de este Registro de Acción Correctiva junto con cualquier otro registro relevante (por ejemplo: Registro de Transporte, Registro de Inspección de Almacenamiento e Inventario, Registro de Aislamiento Espacial, Registro de Cosecha, etc.).

REGISTRO INICIADO POR

Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	Compañía	Departamento

Dirección	Ciudad	Estado	Código Postal

Teléfono	Fax	E-mail

SITIO DE ESTUDIO

Código de Localización del Sitio	Tamaño del Sitio de Estudio (m x m)	No. de Estudios en este Sitio

Localización Legal o Descriptiva del Terreno del Sitio de Estudio o Coordenadas GPS Únicas	Distancia al campo más cercano de las mismas especies (m)	Distancia al cultivo comercial más cercano de cualquier especie (m)	Esta el área de aislamiento controlada por el que maneja el ensayo? ☐ Si ☐ No

MÉTODO DO AISLAMIENTO REPRODUCIVO

☐ Aislamiento Espacial ☐ Destrucción Temprana de Cosecha ☐ Bordos

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA DE CUMPLIMIENTO

Marcar todos los que procedan

☐ Embarque no Autorizado ☐ Artículo Perdido durante el Embarque ☐ Contenedor Primario (el más interno) violado
☐ Registro de Transporte Perdido ☐ Liberación Accidental durante el Transporte ☐ Recibido en el Destino Equivocado
☐ Violación de Área de Aislamiento Espacial ☐ Otro, detallar abajo

ACTIVIDAD QUE REQUIERE ACCIÓN CORRECTIVA

Indicar la Categoría de Actividad que Requiere Acción Correctiva y después llene los requerimientos de Información Relevante abajo:

Transporte y Almacenamiento o Sitio de Estudio

☐ Transporte ☐ Almacenamiento ☐ Plantación ☐ Monitoreo ☐ Cosecha ☐ Otro, describir a continuación

TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO Embarque No.	Articulo No.	Código de la Instalación

Nombre o Identificación del Edificio	Domicilio	Numero de Habitación o Descripción	identificador de Ubicación de Almacén

IDENTIFICACIÓN DEL EVENTO TRANSGÉNICO AFECTADO

Permiso No.	Especie de Planta	Cantidad Aproximada de Materiales Afectados (kg)	Forma del Material ☐ Semilla ☐ Injertos de Yema/Brotes ☐ Transplantes ☐ Tubérculos ☐ Plantas Completas
Permiso No.	Especie de Planta	Cantidad Aproximada de Materiales Afectados (kg)	Forma del Material ☐ Semilla ☐ Injertos de Yema/Brotes ☐ Transplantes ☐ Tubérculos ☐ Plantas Completas

REGISTRO DE ACCIÓN CORRECTIVA

Permiso No.	Especie de Planta	Cantidad Aproximada de Materiales Afectados (kg)	Forma del Material ☐ Semilla ☐ Injertos de Yema/Brotes ☐ Transplantes ☐ Tubérculos ☐ Plantas Completas

DESCRIPCIÓN DE LA ACCIÓN CORRECTIVA REALIZADA

Marcar Todas las que procedan

☐ Destrucción de Material Regulado ☐ Recuperación del Material Derramado ☐ Imponer Restricciones Poscosecha
☐ Entresacado de Plantas Prohibidas ☐ Imposición de una Zona de Aislamiento Espacial ☐ Destrucción del Estudio
☐ Destrucción de Cosecha Vecina
☐ Otro, detallar abajo

ESTA SECCIÓN DEBE LLENARLA LA PARTE AUTORIZADA

COMUNICACIÓN CON LAS AUTORIDADES REGULATORIAS

Nombre del Oficial con Quien se Hizo el Contacto	Departamento	Teléfono	Fax	Fecha de Primer Contacto

Resumir los resultados de la comunicación, incluyendo las opciones acordadas para mitigar el riesgo. Enumerar todas las comunicaciones, registrando fecha e individuo involucrado. Anexar cualquier correspondencia por escrito o transcripciones de comunicaciones orales.

VERIFICACIÓN

Las acciones correctivas detalladas en este reporte se llevaron a cabo en apego a los procedimientos operativos estándar y a las regulaciones aplicables que rigen el transporte, almacenamiento y pruebas de campo de materiales vegetales experimentales modificados genéticamente.

Firma del gerente de la estación, encargado del experimento
ó persona autorizada

_____ Fecha_____

Mediante mi firma hago constar que a mi leal saber y entender la información aquí registrada es veraz y completa

LINEAMIENTOS REGULATORIOS

7CFR340

- 340.0 Restrictions on the Introduction of Regulated Articles
- 340.1 Definitions
- 340.2 Groups of organisms which are or contain plant pests
- 340.3 Notification for the introduction of certain regulated articles
- 340.4 Permits for the introduction of a regulated article.
- 340.5 Petition to amend the list of organisms.
- 340.6 Petition for determination of nonregulated status.
- 340.7 Marking and identity.
- 340.8 Container requirements for the movement of regulated articles.
- 340.9 Cost and charges.

As revised May 1997

340.0 Restrictions on the Introduction of Regulated Articles

(a) No person shall introduce any regulated article unless the Administrator is:

(1) Notified of the introduction in accordance with 340.3, or such introduction is authorized by permit in accordance with 340.4, or such introduction is conditionally exempt from permit requirements under 340.2(b); and

(2) Such introduction is in conformity with all other applicable restrictions in this part. [1]

[1] Part 340 regulates, among other things, the introduction of organisms and products altered or produced through genetic engineering which are plant pests or which there is reason to believe are plant pests. The introduction into the United States of such articles may be subject to other regulations promulgated under the Federal Plant Pest Act (7 U.S.C. 150aa et seq.), the Plant Quarantine Act (7 U.S.C. 151 et seq.) and the Federal Noxious Weed Act (7 U.S.C. 2801 et seq.) and found in 7 CFR parts 319, 321, 330, and 360. For example under regulations promulgated in 7 CFR "Subpart-Nursery Stock" (7 CFR 319.37) a permit is required for the importation of certain classes of nursery stock whether genetically engineered or not. Thus, a person should consult those regulations prior to the importation of any nursery stock.

(b) Any regulated article introduced not in compliance with the requirements of this part shall be subject to the immediate application of such remedial measures or safeguards as an inspector determines necessary to prevent the introduction of such plant pests. [2]

[2] Pursuant to section 105 of the Federal Plant Pest Act (7 U.S.C. 150dd) the Secretary of Agriculture is authorized to order prompt removal from the United States or to seize, quarantine, treat, apply other remedial measures to, destroy, or otherwise dispose of, in such manner as the Secretary deems appropriate, certain regulated

articles which are believed to be infested or infected by or contain a plant pest.

340.1 Definitions.

Terms used in the singular form in this part shall be construed as the plural, and vice versa, as the case may demand. The following terms, when used in this part, shall be construed, respectively, to mean:

Administrator. The Administrator of the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) or any other employee of APHIS to whom the authority has been or may be delegated to act in the Administrator's stead.

Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). An agency of the United States Department of Agriculture.

Antecedent Organism. An organism that has already been the subject of a determination of nonregulated status by APHIS under § 340.6, and that is used as a reference for comparison to the regulated article under consideration under these regulations.

Courtesy permit. A written permit issued by the Administrator in accordance with 340.4(h).

Donor organism. The organism from which genetic material is obtained for transfer to the recipient organism.

Environment. All the land, air, and water; and all living organisms in association with land, air and water.

Expression vector. A cloning vector designed so that a coding sequence inserted at a particular site will be transcribed and translated into protein.

Genetic engineering. The genetic modification of organisms by recombinant DNA techniques.

Inspector. Any employee of the Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, or other person, authorized by the Administrator in accordance with law to enforce the provisions of this part.

Interstate. From any State into or through any other State.

Introduce or introduction. To move into or through the United States, to release into the environment, to move interstate, or any attempt thereat.

Move (moving, movement). To ship, offer for shipment, offer for entry, import, receive for transportation, carry, or otherwise transport or move, or allow to be moved into, through, or within the United States.

Organism. Any active, infective, or dormant stage or life form of an entity characterized as living, including vertebrate and invertebrate animals, plants, bacteria, fungi, mycoplasmas, mycoplasma-like organisms, as well as entities such as viroids, viruses, or any entity characterized as living, related to the foregoing.

Permit. A written permit issued by the Administrator for the introduction of a regulated article under conditions determined by the Administrator not to present a risk of plant pest introduction.

Person. Any individual, partnership, corporation, company, society, association, or other organized group.

Plant. Any living stage or form of any member of the plant kingdom [3] including, but not limited to, eukaryotic algae, mosses, club mosses, ferns, angiosperms, gymnosperms, and lichens (which contain algae) including any parts (e.g. pollen, seeds, cells, tubers, stems) thereof, and any cellular components (e.g. plasmids, ribosomes, etc.) thereof.

[3] The taxonomic scheme for the plant kingdom is that found in Synopsis and Classification of Living Organisms by S.P. Parker, McGraw Hill (1984).

Plant pest. Any living stage (including active and dormant forms) of insects, mites, nematodes, slugs, snails, protozoa, or other invertebrate animals, bacteria, fungi, other parasitic plants or reproductive parts thereof; viruses; or any organisms similar to or allied with any of the foregoing; or any infectious agents or substances, which can directly or indirectly injure or cause disease or damage in or to any plants or parts thereof, or any processed, manufactured, or other products of plants.

Product. Anything made by or from, or derived from an organism, living or dead.

Recipient organism. The organism which receives genetic material from a donor organism.

Regulated article. Any organism which has been altered or produced through genetic engineering, if the donor organism, recipient organism, or vector or vector agent belongs to any genera or taxa designated in 340.2 and meets the definition of plant pest, or is an unclassified organism and/or an organism whose classification is unknown, or any product which contains such an organism, or any other organism or product altered or produced through genetic engineering which the Administrator determines is a plant pest or has reason to believe is a plant pest. Excluded are recipient microorganisms which are not plant pests and which have resulted from the addition of genetic material from a donor organism where the material is well characterized and contains only non-coding regulatory regions.

Release into the environment. The use of a regulated article outside the constraints of physical confinement that are found in a laboratory, contained greenhouse, or a fermenter or other contained structure.

Responsible person. The person who has control and will maintain control over the introduction of the regulated article and assure that all conditions contained in the permit and requirements in this part are complied with. A responsible person shall be a resident of the United States or designate an agent who is a resident of the United States.

Secretary. The Secretary of Agriculture, or any other officer or employee of the Department of Agriculture to whom authority to act in his/her stead has been or may hereafter be delegated.

Stably integrated. The cloned genetic material is contiguous with elements of the recipient genome and is replicated exclusively by mechanisms used by recipient genomic DNA.

State. Any State, the District of Columbia, American Samoa, Guam, Northern Mariana Islands, Puerto Rico, the Virgin Islands

of the United States, and any other Territories or Districts of the United States.

State regulatory official. State official with responsibilities for plant health, or any other duly designated State official, in the State where the introduction is to take place.

United States. All of the States.

Vector or vector agent. Organisms or objects used to transfer genetic material from the donor organism to the recipient organism.

Well-characterized and contains only non-coding regulatory regions (e.g. operators, promoters, origins of replication, terminators, and ribosome binding regions). The genetic material added to a microorganism in which the following can be documented about such genetic material: (a) The exact nucleotide base sequence of the regulatory region and any inserted flanking nucleotides; (b) The regulatory region and any inserted flanking nucleotides do not code for protein or peptide; and (c) The regulatory region solely controls the activity of other sequences that code for protein or peptide molecules or act as recognition sites for the initiation of nucleic acid or protein synthesis.

[52 FR 22908, June 16, 1987, as amended at 53 FR 12913, Apr. 20, 1988; 55 FR 53276, Dec. 28, 1990]

340.2 Groups of organisms which are or contain plant pests and exemptions.

(a) Groups of organisms which are or contain plant pests. The organisms that are or contain plant pests are included in the taxa or group of organisms contained in the following list. Within any taxonomic series included on the list, the lowest unit of classification actually listed is the taxon or group which may contain organisms which are regulated. Organisms belonging to all lower taxa contained within the group listed are included as organisms that may be or may contain plant pests, and are regulated if they meet the definition of plant pest in 340.1. [4]

[4] Any organism belonging to any taxa contained within any listed genera or taxa is only considered to be a plant pest if the organism ``can directly or indirectly injure, or cause disease, or damage in any plants or parts thereof, or any processed, manufactured, or other products of plants.'' Thus a particular unlisted species within a listed genus would be deemed a plant pest for purposes of 340.2, if the scientific literature refers to the organism as a cause of direct or indirect injury, disease, or damage to any plants, plant parts or products of plants. (If there is any question concerning the plant pest status of an organism belonging to any listed genera or taxa, the person proposing to introduce the organism in question should consult with APHIS to determine if the organism is subject to regulation.)

Note: Any genetically engineered organism composed of DNA or RNA sequences, organelles, plasmids, parts, copies, and/or analogs, of or from any of the groups of organisms listed below shall be deemed a regulated article if it also meets the definition of plant pest in 340.1.

GROUP

VIROIDS

Superkingdom Prokaryotae
Kingdom Virus

All members of groups containing plant viruses, and all other
plant and insect viruses

Kingdom Monera

Division Bacteria

Family Pseudomonadaceae
  Genus Pseudomonas
  Genus Xanthomonas
Family Rhizobiaceae
  Genus Rhizobium
  Genus Bradyrhizobium
  Genus Agrobacterium
  Genus Phyllobacterium
Family Enterobacteriaceae
  Genus Erwinia
Family Streptomycetaceae
  Genus Streptomyces
Family Actinomycetacease
  Genus Actinomyces

Coryneform group

  Genus Clavibacter
  Genus Arthrobacter
  Genus Curtobacterium
  Genus Corynebacteria
Gram-negative phloem-limited bacteria associated with plant
    diseases
Gram-negative xylem-limited bacteria associated with plant diseases
And all other bacteria associated with plant or insect diseases
Rickettsiaceae
  Rickettgial-like organisms associated with insect diseases

Class Mollicutes

Order Mycoplasmatales
Family Spiroplasmataceae
  Genus Spiroplasma
Mycoplasma-like organisms associated with plant diseases
Mycoplasma-like organisms associated with insect diseases

Superkingdom Eukaryotae

Kingdom Plantae

Subkingdom Thallobionta

Division Chlorophyta

  Genus Cephaleuros
  Genus Rhodochytrium
  Genus Phyllosiphon
Division Myxomycota

Class Plasmodiophoromycetes

Division Eumycota

Class Chytridiomycetes

Order Chytridiales

Class Oomycetes

Order Lagenidiales
Family Lagenidiaceae
Family Olpidiopsidaceae
Order Peronosporales
Family Albuginaceae
Family Peronosporaceae
Family Pythiaceae
Order Saprolegniales
Family Saprolegniaceae
Family Leptolegniellaceae

Class Zygomycetes

Order Mucorales
Family Choanephoraceae
Family Mucoraceae
Family Entomophthoraceae

Class Hemiascomycetes

Family Protomycetaceae
Family Taphrinaceae

Class Loculoascomycetes

Order Myriangiales
Family Elsinoeaceae
Family Myriangiaceae
Order Asterinales
Order Dothideales
Order Chaetothyriales
Order Hysteriales
Family Parmulariaceae
Family Phillipsiellaceae
Family Hysteriaceae
Order Pleosporales
Order Melanommatales

Class Plectomycetes

Order Eurotiales
Family Ophiostomataceae
Order Ascophaerales

Class Pyrenomycetes

Order Erysiphales
Order Meliolales
Order Xylariales
Order Diaporthales
Order Hypocreales
Order Clavicipitales

Class Discomycetes

Order Phacidiales
Order Helotiales
Family Ascocorticiceae
Family Hemiphacidiaceae
Family Dermataceae
Family Sclerotiniaceae
Order Cytarriales
Order Medeolariales
Order Pezziales

Family Sarcosomataceae
Family Sarcoscyphaceae

Class Teliomycetes

Class Phragmobasidiomycetes

Family Auriculariaceae
Family Ceratobasidiaceae

Class Hymenomycetes

Order Exobasidiales
Order Agaricales
Family Corticiaceae
Family Hymenochaetaceae
Family Echinodontiaceae
Family Fistulinaceae
Family Clavariaceae
Family Polyporaceae
Family Tricholomataceae

Class Hyphomycetes

Class Coelomycetes

And all other fungi associated with plant or insect diseases

Subkingdom Embryobionta

Note: Organisms listed in the Code of Federal Regulations as noxious weeds are regulated under the Federal Noxious Weed Act

Division Magnoliophyta

Family Balanophoraceae-parasitic species
Family Cuscutaceae-parasitic species
Family Hydnoraceae-parasitic species
Family Krameriaceae-parasitic species
Family Lauraceae-parasitic species
  Genus Cassytha
Family Lennoaceae-parasitic species
Family Loranthaceae-parasitic species
Family Myzodendraceae-parasitic species
Family Olacaceae-parasitic species
Family Orobanchaceae-parasitic species
Family Rafflesiaceae-parasitic species
Family Santalaceae-parasitic species
Family Scrophulariaceae-parasitic species
  Genus Alectra
  Genus Bartsia
  Genus Buchnera
  Genus Buttonia
  Genus Castilleja
  Genus Centranthera
  Genus Cordylanthus
  Genus Dasistoma
  Genus Euphrasia
  Genus Gerardia
  Genus Harveya
  Genus Hyobanche
  Genus Lathraea
  Genus Melampyrum
  Genus Melasma
  Genus Orthantha
  Genus Orthocarpus

Genus Pedicularis
Genus Rhamphicarpa
Genus Rhinanthus
Genus Schwalbea
Genus Seymeria
Genus Siphonostegia
Genus Sopubia
Genus Striga
Genus Tozzia
Family Viscaceae-parasitic species

Kingdom Animalia

Subkingdom Protozoa

Genus Phytomonas

And all Protozoa associated with insect diseases

Subkingdom Eumetazoa

Phylum Nemata

Class Secernentea

Order Tylenchida
Family Anguinidae
Family Belonolaimidae
Family Caloosiidae
Family Criconematidae
Family Dolichodoridae
Family Fergusobiidae
Family Hemicycliophoridae
Family Heteroderidae
Family Hoplolaimidae
Family Meloidogynidae
Family Nacobbidae
Family Neotylenchidae
Family Nothotylenchidae
Family Paratylenchidae
Family Pratylenchidae
Family Tylenchidae
Family Tylenchulidae
Order Aphelenchida
Family Aphelenchoididae

Class Adenophorea

Order Dorylaimida
Family Longidoridae
Family Trichodoridae

Phylum Mollusca

Class Gastropoda

Subclass Pulmonata
Order Basommatophora
Superfamily Planorbacea
Order Stylommatophora
Subfamily Strophocheilacea
Family Succineidae
Superfamily Achatinacae
Superfamily Arionacae
Superfamily Limacacea
Superfamily Helicacea

Order Systellommatophora
  Superfamily Veronicellacea

Phylum Arthropoda

Class Arachnida

Order Parasitiformes
  Suborder Mesostigmata
  Superfamily Ascoidea
  Superfamily Dermanyssoidea
Order Acariformes
  Suborder Prostigmata
  Superfamily Eriophyoidea
  Superfamily Tetranychoidea
  Superfamily Eupodoidea
  Superfamily Tydeoidea
  Superfamily Erythraenoidea
  Superfamily Trombidioidea
  Superfamily Hydryphantoidea
  Superfamily Tarsonemoidea
  Superfamily Pyemotoidea
Suborder Astigmata
  Superfamily Hemisarcoptoidea
  Superfamily Acaroidea

Class Diplopoda

Order Polydesmida

Class Insecta

Order Collembola
Family Sminthoridae
Order Isoptera
Order Thysanoptera
Order Orthoptera
Family Acrididae
Family Gryllidae
Family Gryllacrididae
Family Gryllotalpidae
Family Phasmatidae
Family Ronaleidae
Family Tettigoniidae
Family Tetrigidae
Order Hemiptera
Family Thaumastocoridae
Family Aradidae
  Superfamily Piesmatoidea
  Superfamily Lygaeoidea
  Superfamily Idiostoloidea
  Superfamily Coreoidea
  Superfamily Pentatomoidea
  Superfamily Pyrrhocoroidea
  Superfamily Tingoidea
  Superfamily Miroidea
Order Homoptera
Order Coleoptera
Family Anobiidae
Family Apionidae
Family Anthribidae
Family Bostrichidae
Family Brentidae
Family Bruchidae
Family Buprestidae
Family Byturidae

Family Cantharidae
Family Carabidae
Family Cerambycidae
Family Chrysomelidae
Family Coccinellidae
  Subfamily Epilachninae
Family Curculionidae
Family Dermestidae
Family Elateridae
Family Hydrophilidae
  Genus Helophorus
Family Lyctidae
Family Meloidae
Family Mordellidae
Family Platypodidae
Family Scarabaeidae
  Subfamily Melolonthinae
  Subfamily Rutelinae
  Subfamily Cetoniinae
  Subfamily Dynastinae
Family Scolytidae
Family Selbytidae
Family Tenebrionidae
Order Lepidoptera
Order Diptera
Family Agromyzidae
Family Anthomyiidae
Family Cecidomyiidae
Family Chloropidae
Family Ephydridae
Family Lonchaeidae
Family Muscidae
  Genus Atherigona
Family Otitidae
  Genus Euxeta
Family Syrphidae
Family Tephritidae
Family Tipulidae
Order Hymenoptera
Family Apidae
Family Caphidae
Family Chalcidae
Family Cynipidae
Family Eurytomidae
Family Formicidae
Family Psilidae
Family Siricidae
Family Tenthredinidae
Family Torymidae
Family Xylocopidae

Unclassified organisms and/or organisms whose classification is unknown.

(b) *Exemptions*. (1) A limited permit for interstate movement shall not be required for genetic material from any plant pest contained in Escherichia coli genotype K-12 (strain K-12 and its derivatives), sterile strains of *Saccharomyces cerevisiae*, or asporogenic strains of *Bacillus subtilis*, provided that all the following conditions are met:

(i) The microorganisms are shipped in a container that meets the requirements of 340.8(b)(3) of this part;

(ii) The cloned genetic material is maintained on a nonconjugation proficient plasmid and the host does not contain other conjugation proficient plasmids or generalized transducing phages;

(iii) The cloned material does not include the complete infectious genome of a known plant pest;
(iv) The cloned genes are not carried on an expression vector if the cloned genes code for:
(A) A toxin to plants or plant products, or a toxin to organisms beneficial to plants; or
(B) Other factors directly involved in eliciting plant disease (i.e., cell wall degrading enzymes); or
(C) Substances acting as, or inhibitory to, plant growth regulators.
(2) A limited permit for interstate movement is not required for genetic material from any plant pest contained in the genome of the plant *Arabiodopsis thaliana*, provided that all of the following conditions are met:
(i) The plants or plant materials are shipped in a container that meets the requirements of 340.8(b) (1), (2), and (3) of this part;
(ii) The cloned genetic material is stably integrated into the plant genome;
(iii) The cloned material does not include the complete infectious genome of a known plant pest.

[52 FR 22908, June 16, 1987, as amended at 53 FR 12913, Apr. 20, 1988; 55 FR 53276, Dec. 28, 1990]

340.3 Notification for the introduction of certain regulated articles.[5]

[5]APHIS may issue guidelines regarding scientific procedures, practices, or protocols which it has found acceptable in making various determinations under the regulations. A person may follow an APHIS guideline or follow different procedures, practices, or protocols. When different procedures, practices, or protocols are followed, a person may, but is not required to, discuss the matter in advance with APHIS to help ensure that the procedures, practices, or protocols to be followed will be acceptable to APHIS.

(a) *General*. Certain regulated articles may be introduced without a permit, provided that the introduction is in compliance with the requirements of this section. Any other introduction of regulated articles require a permit under 340.4, with the exception of introductions that are conditionally exempt from permit requirements under 340.2(b) of this part.
(b) *Regulated articles eligible for introduction under the notification procedure*. Regulated articles which meet all of the following six requirements and the performance standards set forth in paragraph (c) of this section are eligible for introduction under the notification procedure.
(1) The regulated article is any plant species that is not listed as a noxious weed in regulations at 7 CFR part 360 under the Federal Noxious Weed Act (7 U.S.C. 2809), and, when being considered for release into the environment, the regulated articles is not considered by the Administrator to be a weed in the area of release into the environment.
(2) The introduced genetic material is "stably integrated" in the plant genome, as defined in 340.1.
(3) The function of the introduced genetic material is known and its expression in the regulated article does not result in plant disease.
(4) The introduced genetic material does not:
(i) Cause the production of an infectious entity, or
(ii) Encode substances that are known or likely to be toxic to nontarget organisms known or likely to feed or live on the plant species, or
(iii) Encode products intended for pharmaceutical use.

(5) To ensure the introduced genetic sequences do not pose a significant risk of the creation of any new plant virus, plant virus-derived sequences must be:

(i) Noncoding regulatory sequences of known function, or

(ii) Sense or antisense genetic constructs derived from viral genes from plant viruses that are prevalent and endemic in the area where the introduction will occur and that infect plants of the same host species, and that do not encode a functional noncapsid gene product responsible for cell-to-cell movement of the virus.

(6) The plant has not been modified to contain the following genetic material from animal or human pathogens:

(i) Any nucleic acid sequence derived from an animal or human virus, or

(ii) Coding sequences whose products are known or likely causal agents of disease in animals or humans.

(c) *Performance standards for introductions under the notification procedure*. The following performance standards must be met for any introductions under the notification procedure.

(1) If the plants or plant materials are shipped, they must be shipped in such a way that the viable plant material is unlikely to be disseminated while in transit and must be maintained at the destination facility in such a way that there is no release into the environment.

(2) When the introduction is an environmental release, the regulated article must be planted in such a way that they are not inadvertently mixed with non-regulated plant materials of any species which are not part of the environmental release.

(3) The plants and plant parts must be maintained in such a way that the identity of all material is known while it is in use, and the plant parts must be contained or devitalized when no longer in use.

(4) There must be no viable vector agent associated with the regulated article.

(5) The field trial must be conducted such that:

(i) The regulated article will not persist in the environment, and

(ii) No offspring can be produced that could persist in the environment.

(6) Upon termination of the field test:

(i) No viable material shall remain which is likely to volunteer in subsequent seasons, or

(ii) Volunteers shall be managed to prevent persistence in the environment.

(d) *Procedural requirements for notifying APHIS*. The following procedures shall be followed for any introductions under the notification procedure:

(1) Notification should be directed to Director, Plant Protection and Quarantine, Biotechnology and Scientific Services, Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, 4700 River Road, Riverdale Maryland 20737.

(2) The notification shall include the following:

(i) Name, title, address, telephone number, and signature of the responsible person;

(ii) Information necessary to identify the regulated article(s), including:

(A) The scientific, common, or trade names, and phenotype of regulated article,

(B) The designations for the genetic loci, the encoded proteins or functions, and donor organisms for all genes from which introduced genetic material was derived, and

(C) The method by which the recipient was transformed;

(iii) The names and locations of the origination and destination facilities for movement or the field site location for the environmental release; and the size of the introduction,

(iv) The date and, in the case of environmental release,

the expected duration of the introduction (release); and

(v) A statement that certifies that introduction of the regulated article will be in accordance with the provisions of this section.

(3) Notification must be submitted to APHIS:

(i) At least 10 days prior to the day of introduction, if the introduction is interstate movement.

(ii) At least 30 days prior to the day of introduction, if the introduction is an importation.

(iii) At least 30 days prior to the day of introduction, if the introduction is an environmental release.

(4) Field test reports must be submitted to APHIS within 6 months after the termination of the field test. Field test reports shall include the APHIS reference number methods of observation, resulting data, and analysis regarding all deleterious effects on plants, nontarget organisms, or the environment.

(5) The Administrator shall be notified of any unusual occurrence within the time periods and in the manner specified in 340.4(f)(10).

(6) Access shall be allowed for APHIS and State regulatory officials to inspect facilities and/or the field test site and any records necessary to evaluate compliance with the provisions of paragraphs (b) and (c) of this section.

(e) *Administrative action in response to notification*.

(1) APHIS will provide copies of all notifications to appropriate State regulatory official(s) for review within 5 business days of receipt. Comments to APHIS from appropriate State regulatory officials in response to notifications for interstate movement of regulated articles will not be required by APHIS prior to acknowledgement, although States may provide their reviews to APHIS at their discretion.

(2) APHIS will provide acknowledgement within 10 days of receipt that the interstate movement is appropriate under notification.

(3) APHIS will provide acknowledgement within 30 days of receipt that the importation is appropriate under notification.

(4) APHIS will provide acknowledgement within 30 days of receipt that the environmental release is appropriate under notification. Such acknowledgement will apply to field testing for 1 year from the date of introduction, and may be renewed annually by submission of an additional notification to APHIS.

(5) A person denied permission for introduction of a regulated article under notification may apply for a permit for introduction of that regulated article without prejudice.

9. A new 340.6 is added to read as follows:

340.4 Permits for the introduction of a regulated article.[6]

[6] See footnote 5 in 340.3

(a) *Application for permit*. Two copies of a written application for a permit to introduce a regulated article, which may be obtained from APHIS, shall be submitted by the responsible person the Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Pest and Quarantine, Biotechnology and Scientific Services, Biotechnology Permits, 4700 River Road, Unit 147, Riverdale, Maryland 20737-1237. If there are portions of the application deemed to contain trade secret or confidential business information (CBI), each page of the application containing such information should be marked ``CBI Copy''. In addition, those portions of the application which are deemed ``CBI'' shall be so designated. The second copy shall have all such CBI deleted and shall be marked on each page of the application

where CBI was deleted, ``CBI Deleted''. If an application does not contain CBI then the first page of both copies shall be marked ``No CBI''.

(b) *Permit for release into the environment*. An application for the release into the environment of a regulated article shall be submitted at least 120 days in advance of the proposed release into the environment. An initial review shall be completed by APHIS within 30 days of the receipt of the application. If the application is complete, the responsible individual shall be notified of the date of receipt of the application for purposes of advising the applicant when the 120 day review period commenced.[6] If the application is not complete, the responsible individual will be advised what additional information must be submitted. APHIS shall commence the 120 day review period upon receipt of the additional information, assuming the additional information submitted is adequate. When it is determined that an application is complete, APHIS shall submit to the State department of agriculture of the State where the release is planned, a copy of the initial review and a copy of the application marked, ``CBI Deleted'', or ``No CBI'' for State notification and review. The application shall include the following information: [7]

[6] The 120 day review period would be extended if preparation of an environmental impact statement in addition to an environmental assessment was necessary.

[7] Application forms are available without charge from the Biotechnology Permit Unit, Plant Protection and Quarantine, Biotechnology and Scientific Services, Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, 4700 River Rd, Unit 147, Riverdale, Maryland 20737, or from local offices which are listed in telephone directories. A person should specify in requesting the application that the permit is for the introduction of a regulated article subject to regulation under part 340.

(1) Name, title, address, telephone number, signature of the responsible person and type of permit requested (for importation, interstate movement, or release into the environment);

(2) All scientific, common, and trade names, and all designations necessary to identify the: Donor organism(s); recipient organism(s); vector or vector agent(s); constituent of each regulated article which is a product; and, regulated article;

(3) Names, addresses, and telephone numbers of the persons who developed and/or supplied the regulated article;

(4) A description of the means of movement (e.g., mail, common carrier, baggage, or handcarried (and by whom));

(5) A description of the anticipated or actual expression of the altered genetic material in the regulated article and how that expression differs from the expression in the non-modified parental organism (e.g., morphological or structural characteristics, physiological activities and processes, number of copies of inserted genetic material and the physical state of this material inside the recipient organism (integrated or extrachromosomal), products and secretions, growth characteristics);

(6) A detailed description of the molecular biology of the system (e.g., donor-recipient-vector) which is or will be used to produce the regulated article;

(7) Country and locality where the donor organism, recipient organism, vector or vector agent, and regulated article were collected, developed, and produced;

(8) A detailed description of the purpose for the introduction of the regulated article including a detailed description of the proposed experimental and/or production design;

(9) The quantity of the regulated article to be introduced and proposed schedule and number of introductions;

(10) A detailed description of the processes, procedures, and safeguards which have been used or will be used in the country

of origin and in the United States to prevent contamination, release, and dissemination in the production of the: Donor organism; recipient organism; vector or vector agent; constituent of each regulated article which is a product; and regulated article;

(11) A detailed description of the intended destination (including final and all intermediate destinations), uses, and/or distribution of the regulated article (e.g., greenhouses, laboratory, or growth chamber location; field trial location; pilot project location; production, propagation, and manufacture location; proposed sale and distribution location);

(12) A detailed description of the proposed procedures, processes, and safeguards which will be used to prevent escape and dissemination of the regulated article at each of the intended destinations;

(13) A detailed description of any biological material (e.g., culture medium, or host material) accompanying the regulated article during movement; and

(14) A detailed description of the proposed method of final disposition of the regulated article.

(c) Limited permits for interstate movement or importation of a regulated article. An application for the interstate movement or importation of a regulated article shall be submitted at least 60 days in advance of the first proposed interstate movement and at least 60 days prior to each importation. An initial review shall be completed by APHIS within 15 days of the receipt of the application. If the application is complete, the responsible person shall be notified of the date of receipt of the application for purposes of advising the applicant when the 60 day review period commenced. If the application is not complete, the responsible person will be advised what additional information must be submitted. APHIS shall commence the 60 day review period upon receipt of the additional information, assuming the additional information submitted is adequate. When it is determined that an application is complete, APHIS shall submit to the State department of agriculture of the State of destination of the regulated article a copy of the initial review and the application marked, ``CBI Deleted'', or ``No CBI'' for State notification and review.

(1) Limited permit for interstate movement. The responsible person may apply for a single limited permit for the interstate movement of multiple regulated articles in lieu of submitting an application for each individual interstate movement. Each limited permit issued shall be numbered and shall be valid for one year from the date of issuance. If a permit is sought for multiple interstate movements between contained facilities the responsible individual shall specify in the permit application all the regulated articles to be moved interstate; the origins and destinations of all proposed shipments; a detailed description of all the contained facilities where regulated articles will be utilized at destination; and a description of the containers that will be used to transport the regulated articles. A limited permit for interstate movement of a regulated article shall only be valid for the movement of those regulated articles moving between those locations specified in the application. If a person seeks to move regulated articles other than those specified in the application, or to a location other than those listed in the application, a supplemental application shall be submitted to APHIS. No person shall move a regulated article interstate unless the number of the limited permit appears on the outside of the shipping container. The responsible person shipping a regulated article interstate shall keep records for one year demonstrating that the regulated article arrived at its intended destination. The responsible person seeking a limited permit for interstate movement shall submit on an application form obtained from APHIS the data required by paragraphs (b) (1), (2), (4), (6), (7), (9), and (11) through (14) of this section.

(2) Limited permit for importation. The responsible person seeking a permit for the importation of a regulated article shall submit an application for a permit prior to the importation

of each shipment of regulated articles. The responsible person importing a regulated article shall keep records for one year demonstrating that the regulated article arrived at its intended destination. The responsible person seeking a limited permit for importation shall submit on an application form obtained from APHIS data required by paragraphs (b) (1), (2), (4), (6), (7), (9), and (11) through (14) of this section. [8]

[8] Renewals may receive shorter review. In the case of a renewal for a limited permit for importation that has been issued less than one year earlier, APHIS will notify the responsible person within 15 days that either: (1) The renewal permit is approved or (2) that a 60 day review period is necessary because the conditions of the original permit have changed.

(d) *Premises inspection*. An inspector may inspect the site or facility where regulated articles are proposed, pursuant to a permit, to be released into the environment or contained after their interstate movement or importation. Failure to allow the inspection of a premises prior to the issuance of a permit or limited permit shall be grounds for the denial of the permit.

(e) *Administrative action on applications*. After receipt and review by APHIS of the application and the data submitted pursuant to paragraph (a) of this section, including any additional information requested by APHIS, a permit shall be granted or denied. If a permit is denied, the applicant shall be promptly informed of the reasons why the permit was denied and given the opportunity to appeal the denial in accordance with the provisions of paragraph (g) of this section. If a permit is granted, the permit will specify the applicable conditions for introduction of the regulated article under this part.

(f) *Permit conditions*. A person who is issued a permit and his/her employees or agents shall comply with the following conditions, and any supplemental conditions which shall be listed on the permit, as deemed by the Administrator to be necessary to prevent the dissemination and establishment of plant pests:

(1) The regulated article shall be maintained and disposed of (when necessary) in a manner so as to prevent the dissemination and establishment of plant pests.

(2) All packing material, shipping containers, and any other material accompanying the regulated article shall be treated or disposed of in such a manner so as to prevent the dissemination and establishment of plant pests.

(3) The regulated article shall be kept separate from other organisms, except as specifically allowed in the permit;

(4) The regulated article shall be maintained only in areas and premises specified in the permit;

(5) An inspector shall be allowed access, during regular business hours, to the place where the regulated article is located and to any records relating to the introduction of a regulated article;

(6) The regulated article shall, when possible, be kept identified with a label showing the name of the regulated article, and the date of importation;

(7) The regulated article shall be subject to the application of measures determined by the Administrator to be necessary to prevent the accidental or unauthorized release of the regulated article;

(8) The regulated article shall be subject to the application of remedial measures (including disposal) determined by the Administrator to be necessary to prevent the spread of plant pests;

(9) A person who has been issued a permit shall submit to APHIS a field test report within 6 months after the termination of the field test. A field test report shall include the APHIS reference number, methods of observation, resulting data, and analysis regarding all

deleterious effects on plants, nontarget organisms, or the environment;
(10) APHIS shall be notified within the time periods and manner specified below, in the event of the following occurrences:
(i) Orally notified immediately upon discovery and notify in writing within 24 hours in the event of any accidental or unauthorized release of the regulated article;
(ii) In writing as soon as possible but not later than within 5 working days if the regulated article or associated host organism is found to have characteristics substantially different from those listed in the application for a permit or suffers any unusual occurrence (excessive mortality or morbidity, or unanticipated effect on non-target organisms);
(11) A permittee or his/her agent and any person who seeks to import a regulated article into the United States shall:
(i) Import or offer the regulated article for entry only at a port of entry which is designated by an asterisk in 7 CFR 319.37-14(b);
(ii) Notify APHIS promptly upon arrival of any regulated article at a port of entry, of its arrival by such means as a manifest, customs entry document, commercial invoice, waybill, a broker's document, or a notice form provided for such purpose; and
(iii) Mark and identify the regulated article in accordance with 340.5 of this part.
(g) *Withdrawal or denial of a permit*. Any permit which has been issued may be withdrawn by an inspector or the Administrator if he/she determines that the holder thereof has not complied with one or more of the conditions listed on the permit. APHIS will confirm the reasons for the withdrawal of the permit in writing within ten (10) days. Any person whose permit has been withdrawn or any person who has been denied a permit may appeal the decision in writing to the Administrator within ten (10) days after receiving the written notification of the withdrawal or denial. The appeal shall state all of the facts and reasons upon which the person relies to show that the permit was wrongfully withdrawn or denied. The Administrator shall grant or deny the appeal, in writing, stating the reasons for the decision as promptly as circumstances allow. If there is a conflict as to any material fact, a hearing shall be held to resolve such conflict. Rules of practice concerning such a hearing will be adopted by the Administrator.
(h) *Courtesy permit*-
(1) Issuance. The Administrator may issue a courtesy permit for the introduction of organisms modified through genetic engineering which are not subject to regulation under this part to facilitate movement when the movement might otherwise be impeded because of the similarity of the organism to other organisms regulated under this part.
(2) Application. A person seeking a courtesy permit shall submit on an application form obtained from APHIS data required by paragraphs (b) (1), (2), and (5) of this section and shall indicate such data is being submitted as a request for a courtesy permit. A person should also include a statement explaining why he or she believes the organism or product does not come within the definition of a regulated article.
The application shall be submitted at least 60 days prior to the time the courtesy permit is sought.
(3) Administrative action. APHIS shall complete an initial review within 15 days of the date of receipt of the application. If the application is complete, the responsible individual shall be notified of the date of receipt of the application for purposes of advising the applicant when the 60 day review period commenced. If the application is not complete, the responsible individual will be advised what additional information must be submitted, and shall commence the 60 day review period upon receipt of the additional information, assuming the additional information submitted is adequate. Within 60 days from the date of receipt of a complete application, APHIS will either issue a courtesy permit or advise the responsible

individual that a permit is required under paragraph (b) or (c) of this section.

340.5 Petition to amend the list of organisms.[10]

[10] See footnote 5 in 340.3

(a) *General*. Any person may submit to the Administrator a petition to amend the list of organisms in 340.2 of this part by adding or deleting any genus, species, or subspecies. A petitioner may supplement, amend, or withdraw a petition in writing without prior approval of the Administrator and without prejudice to resubmission at any time until the Administrator rules on the petition. A petition to amend the list of organisms shall be submitted in accordance with the procedures and format specified by this section.

(b) *Submission procedures and format*. A person shall submit two copies of a petition to Biotechnology and Scientific Services, PPQ Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, 4700 River Rd, Unit 147, Riverdale, MD 20737.
The petition should be dated, and structured as follows:

PETITION TO AMEND 7 CFR 340.2

The undersigned submits this petition under 7 CFR 340.4 to request that the Administrator, [add the following genus, species, or subspecies to the list of organisms in 7 CFR 340.2] or [to remove the following genus, species, or subspecies from the list of organisms in 340.2].

A. Statement of Grounds

(A person must present a full statement explaining the factual grounds why the genus, species, or subspecies to be added to 340.2 of this part is a plant pest or why there is reason to believe the genus, species, or subspecies is a plant pest or why the genus, species, or subspecies sought to be removed is not a plant pest or why there is reason to believe the genus, species, or subspecies is not a plant pest. The petition should include copies of scientific literature which the petitioner is relying upon, copies of unpublished studies, or data from tests performed. The petition should not include trade secret or confidential business information.

A person should also include representative information known to the petitioner which would be unfavorable to a petition for listing or delisting. (If a person is not aware of any unfavorable information the petition should state, Unfavorable Information: NONE).

B. Certification

The undersigned certifies, that to the best knowledge and belief of the undersigned, this petition includes all information and views on which the petitioner relies, and that it includes representative data and information known to the petitioner which are unfavorable to the petition.
(Signature) ----------
(Name of petitioner) ----------
(Mailing address) ----------
(Telephone number) ----------

(c) *Administrative action on a petition*.

(1) A petition to amend the list of organisms which meets the requirements of paragraph (b) of this section will be filed by the Administrator, stamped with the date of filing, and assigned a docket number. The docket number shall identify the file

established for all submissions relating to the petition. APHIS will promptly notify the petitioner in writing of the filing and docket number of a petition. If a petition does not meet the requirements of paragraph (b) of this section, the petitioner shall be sent a notice indicating how the petition is deficient.

(2) After the filing of a petition to amend the list or organisms USDA shall publish a proposal in the Federal Register to amend 340.2 and solicit comments thereon from the public. An interested person may submit written comments to APHIS on a filed petition, which shall become part of the docket file.

(3) The Administrator shall furnish a response to each petitioner within 180 days of receipt of the petition. The response will either: (i) Approve the petition in whole or in part in which case the Administrator shall concurrently take appropriate action (publication of a document in the Federal Register amending 340.2 of this part; or (ii) deny the petition in whole or in part. The petitioner shall be notified in writing of the Administrator's decision. The decision shall be placed in the public docket file in the offices of APHIS, and in the form of a notice published in the Federal Register.

340.6 Petition for determination of nonregulated status. [11]

[11] See footnote 5 in 340.3

(a) *General*. Any person may submit to the Administrator, a petition to seek a determination that an article should not be regulated under this part. A petitioner may supplement, amend, or withdraw a petition in writing without prior approval of the Administrator, and without affecting resubmission at any time until the Administrator rules on the petition. A petition for determination of nonregulated status shall be submitted in accordance with the procedure and format specified in this section.

(b) *Submission procedures and format*. A person shall submit two copies of a petition to the Administrator c/o, Plant Protection and Quarantine, Biotechnology and Scientific Services, APHIS, USDA, 4700 River Road, Unit 147, Riverdale, MD 20737. The petition shall be dated and structured as follows:

Petition for Determination of Nonregulated Status

The undersigned submits this petition under 7 CFR 340.6 to request that the Administrator make a determination that the article should not be regulated under 7 CFR part 340.

(Signature)

A. Statement of Grounds

A person must present a full statement explaining the factual grounds why the organism should not be regulated under 7 CFR part 340. The petitioner shall include copies of scientific literature, copies of unpublished studies, when available, and data from tests performed upon which to base a determination. The petition shall include all information set forth in paragraph (c) of 7 CFR 340.6. If there are portions of the petition deemed to contain trade secret or confidential business information (CBI), each page of the petition containing such information should be marked "CBI Copy". In addition, those portions of the petition which are deemed "CBI" shall be so designated. The second copy shall have all such CBI deleted and shall have marked on each page where the CBI was deleted: "CBI Deleted." If a petition does not contain CBI, the first page of both copies shall be marked: "No CBI."

A person shall also include information known to the petitioner which would be unfavorable to a petition. If a person is not aware of any unfavorable information, the petition should state, "Unfavorable information: NONE."

B. Certification

The undersigned certifies, that to the best knowledge and belief of the undersigned, this petition includes all information and views on which to base a determination, and that it includes relevant data and information known to the petitioner which are unfavorable to the petition.

(Signature)----------

(Name of Petitioner)----------

(Mailing Address)----------

(Telephone Number)----------

(c) *Required data and information*.

The petition shall include the following information:

(1) Description of the biology of the nonmodified recipient plant and information necessary to identify the recipient plant in the narrowest taxonomic grouping applicable.

(2) Relevant experimental data and publications.

(3) A detailed description of the differences in genotype between the regulated article and the nonmodified recipient organism. Include all scientific, common, or trade names, and all designations necessary to identify: the donor organism(s), the nature of the transformation system (vector or vector agent(s)), the inserted genetic material and its product(s), and the regulated article. Include country and locality where the donor, the recipient, and the vector organisms and the regulated articles are collected, developed, and produced.

(4) A detailed description of the phenotype of the regulated article. Describe known and potential differences from the unmodified recipient organism that would substantiate that the regulated article is unlikely to pose a greater plant pest risk than the unmodified organism from which it was derived, including but not limited to: Plant pest risk characteristics, disease and pest susceptibilities, expression of the gene product, new enzymes, or changes to plant metabolism, weediness of the regulated article, impact on the weediness of any other plant with which it can interbreed, agricultural or cultivation practices, effects of the regulated article on nontarget organisms, indirect plant pest effects on other agricultural products, transfer of genetic information to organisms with which it cannot interbreed, and any other information which the Administrator believes to be relevant to a determination. Any information known to the petitioner that indicates that a regulated article may pose a greater plant pest risk than the unmodified recipient organism shall also be included.

(5) Field test reports for all trials conducted under permit or notification procedures, involving the regulated article, that were submitted prior to submission of a petition for determination of nonregulated status or prior to submission of a request for extension of a determination of nonregulated status under paragraph (e) of this part. Field test reports shall include the APHIS reference number, methods of observation, resulting data, and analysis regarding all deleterious effects on plants, nontarget organisms, or the environment.

(d) *Administrative action on a petition.*

(1) A petition for determination of nonregulated status under this part which meets the requirements of paragraphs (b) and (c) of this section will be filed by the Administrator stamped with the date of filing, and assigned a petition number. The petition number shall identify the file established for all submissions relating to the petition. APHIS will promptly notify the petitioner in writing of the filing and the assigned petition number. If a petition does not meet the requirements specified in this section, the petitioner shall be sent a notice

indicating how the petition is deficient.

(2) After the filing of a completed petition, APHIS shall publish a notice in the Federal Register. This notice shall specify that comments will be accepted from the public on the filed petition during a 60 day period commencing with the date of the notice. During the comment period, any interested person may submit to the Administrator written comments, regarding the filed petition, which shall become part of the petition file.

(3) The Administrator shall, based upon available information, furnish a response to each petitioner within 180 days of receipt of a completed petition. The response will either:

(i) Approve the petition in whole or in part; or

(ii) deny the petition.

The petitioner shall be notified in writing of the Administrator's decision. The decision shall be placed in the public petition file in the offices of APHIS and notice of availability published in the Federal Register.

(e) *Extensions to determinations of nonregulated status.*

(1) The Administrator may determine that a regulated article does not pose a potential for plant pest risk, and should therefore not be regulated under this part, based on the similarity of that organism to an antecedent organism.

(2) A person may request that APHIS extend a determination of nonregulated status to other organisms. Such a request shall include information to establish the similarity of the antecedent organism and the regulated articles in question.

(3) APHIS will announce in the **Federal Register** all preliminary decisions to extend determinations of nonregulated status 30 days before the decisions become final and effective. If additional information becomes available that APHIS believes justifies changing its decision, it will issue a revised decision.

(4) If a request to APHIS to extend a determination of nonregulated status under this part is denied, APHIS will inform the submitter of that request of the reasons for denial. The submitter may submit a modified request or a separate petition for determination of nonregulated status without prejudice.

(f) *Denial of a petition; appeal*.

(1) The Administrator's written notification of denial of a petition shall briefly set forth the reason for such denial. The written notification shall be sent by certified mail. Any person whose petition has been denied may appeal the determination in writing to the Administrator within 10 days from receipt of the written notification of denial.

(2) The appeal shall state all of the facts and reasons upon which the person relies, including any new information, to show that the petition was wrongfully denied. The Administrator shall grant or deny the appeal, in writing, stating the reasons for the decision as promptly as circumstances allow. An informal hearing may be held by the Administrator if there is a dispute of a material fact. Rules of Practice concerning such a hearing will be adopted by the Administrator.

340.7 Marking and identity.

(a) Any regulated article to be imported other than by mail, shall, at the time of importation into the United States, plainly and correctly bear on the outer container the following information:

(1) General nature and quantity of the contents;

(2) Country and locality where collected, developed, manufactured, reared, cultivated or cultured;

(3) Name and address of shipper, owner, or person shipping or forwarding the organism;

(4) Name, address, and telephone number of consignee;

(5) Identifying shipper's mark and number; and
(6) Number of written permit authorizing the importation.
(b) Any regulated article imported by mail, shall be plainly and correctly addressed and mailed to APHIS at a port of entry designated by an asterisk in 7 CFR 319.37-14(b) and shall be accompanied by a separate sheet of paper within the package plainly and correctly bearing the name, address, and telephone number of the intended recipient, and shall plainly and correctly bear on the outer container the following information:
(1) General nature and quantity of the contents;
(2) Country and locality where collected, developed, manufactured, reared, cultivated, or cured;
(3) Name and address of shipper, owner, or person shipping or forwarding the regulated article; and
(4) Number of permit authorizing the importation;
(c) Any regulated article imported into the United States by mail or otherwise shall, at the time of importation or offer for importation into the United States, be accompanied by an invoice or packing list indicating the contents of the shipment.

340.8 Container requirements for the movement of regulated articles.

(a) *General requirements*. A regulated article shall not be moved unless it complies with the provisions of paragraph (b) of this section, unless a variance has been granted in accordance with the provisions of paragraph (c) of this section. [12]

[12] The requirements of this section are in addition to and not in lieu of any other packing requirements such as those for the transportation of etiologic agents prescribed ty the Department of Transportation in Title 49 CFR or any other agency of the Federal government.

(b) *Container requirements-*
(1) Plants and plant parts. All plants or plant parts, except seeds, cells, and subcellular elements, shall be packed in a sealed plastic bag of at least 5 mil thickness, inside a sturdy, sealed, leak-proof, outer shipping container constructed of corrugated fiberboard, corrogated cardboard, wood, or other material of equivalent strength.
(2) Seeds. All seeds shall be transported in a sealed plastic bag of at least 5 mil thickness, inside a sealed metal container, which shall be placed inside a second sealed metal container. Shock absorbing cushioning material shall be placed between the inner and outer metal containers. Each metal container shall be independently capable of protecting the seeds and preventing spillage or escape. Each set of metal containers shall then be enclosed in a sturdy outer shipping container constructed of corrugated fiberboard, corrugated cardboard, wood, or other material of equivalent strength.
(3) Live microorganisms and/or etiologic agents, cells, or subcellular elements. All regulated articles which are live (non-inactivated) microorganisms, or etiologic agents, cells, or subcellular elements shall be packed as specified below:
(i) Volume not exceeding 50 ml. Regulated articles not exceeding 50 ml shall be placed in a securely closed, watertight container (primary container, test tube, vial, etc.) which shall be enclosed in a second, durable watertight container (secondary container). Several primary containers may be enclosed in a single secondary container, if the total volume of all the primary containers so enclosed does not exceed 50 ml. The space at the top, bottom, and sides between the primary and secondary containers shall contain sufficient nonparticulate absorbent material (e.g., paper towel) to absorb the entire contents of the primary container(s) in case of breakage or leakage. Each set of primary and secondary

containers shall then be enclosed in an outer shipping container constructed of corrugated fiberboard, corrugated cardboard, wood, or other material of equivalent strength.

(ii) Volume greater than 50 ml. Regulated articles which exceed a volume of 50 ml. shall comply with requirements specified in paragraph (b)(3)(i) of this section. In addition, a shock absorbing material, in volume at least equal to that of the absorbent material between the primary and secondary containers, shall be placed at the top, bottom, and sides between the secondary container and the outer shipping container. single primary containers shall not contain more than 1,000 ml. of material. However, two or more primary containers whose combined volumes do not exceed 1,000 ml. may be placed in a single, secondary container. The maximum amount of microorganisms or etiologic agents, cells, or subcellular elements which may be enclosed within a single outer shipping container shall not exceed 4,000 ml.

(iii) Dry ice. If dry ice is used as a refrigerant, it shall be placed outside the secondary container(s). If dry ice is used between the secondary container and the outer shipping container, the shock absorbing material shall be placed so that the secondary container does not become loose inside the outer shipping container as the dry ice sublimates.

(4) Insects, mites, and related organisms. Insects, mites, and other small arthropods shall be packed for shipment as specified in this paragraph or in paragraph (b)(3) of this section. Insects (any life stage) shall be placed in an escape-proof primary shipping container (insulated vacuum container, glass, metal, plastic, etc.) and sealed to prevent escape. Such primary container shall be placed securely within a secondary shipping container of crushproof styrofoam or other material of equivalent strength; one or more rigid ice packs may also be placed within the secondary shipping container; and sufficient packing material shall be added around the primary container to prevent movement of the primary shipping container. The secondary (styrofoam or other) container shall be placed securely within an outer shipping container constructed of corrugated fiberboard, corrugated cardboard, wood, or other material of equivalent strength.

(5) Other macroscopic organisms. Other macroscopic organisms not covered in paragraphs (b) (1), (2), and (4) of this section which do not require continuous access to atmospheric oxygen shall be packaged as specified in paragraph (b)(3) or (b)(4) of this section. All macroscopic organisms which are not plants and which require continuous access to atmospheric oxygen shall be placed in primary shipping containers constructed of a sturdy, crush-proof frame of wood, metal, or equivalent strength material, surrounded by escape-proof mesh or netting of a strength and mesh size sufficient to prevent the escape of the smallest organism in the shipment, with edges and seams of the mesh or netting sealed to prevent escape or organisms. Each primary shipping container shall be securely placed within a larger secondary shipping container constructed of wood, metal, or equivalent strength material. The primary and secondary shipping containers shall then be placed securely within an outer shipping container constructed of corrugated fiberboard, corrugated cardboard, wood, or other material of equivalent strength, which outer container may have air holes or spaces in the sides and/or ends of the container, provided that the outer shipping container must retain sufficient strength to prevent crushing of the primary and secondary shipping containers.

(c) Request for a variance from container requirements. A responsible person who believes the container requirements normally applicable to the movement of the person's regulated article(s) are inappropriate due to unique circumstances (such as the nature, volume, or life stage of the regulated article) may submit in an application for a permit, a request for a variance from the container requirements. The request for a variance under this

section shall consist of a short statement describing why the normally applicable container requirements are inappropriate for the regulated article which the person proposes to move and what container requirements the person would use in lieu of the normally prescribed container requirements. USDA shall advise the responsible person in writing at the time a permit is granted on the person's request for a variance.

340.9 Cost and charges.

The services of the inspector during regularly assigned hours of duty and at the usual places of duty shall be furnished without cost.[13] The U.S. Department of Agriculture will not be responsible for any costs or charges incident to inspections or compliance with the provisions of this part, other than for the services of the inspector.

[13] The Department's provisions relating to overtime charges for an inspector's services are set forth in 7 CFR part 354.

Permits, Notifications, and Petitions

APHIS regulates the introduction (importation, interstate movement, or environmental release) of certain genetically engineered (GE) organisms. All regulated introductions of GE organisms must be authorized by APHIS under either its permitting or notification procedures.

When a developer has collected enough evidence that a GE organism poses no more of a plant pest risk than an equivalent non-GE organism, the developer may petition APHIS to grant the GE organism non-regulated status. If the petition is approved by APHIS, the GE organism may then be introduced into the United States without any further APHIS regulatory oversight.

Each section below contains guidance, resources, application information, and status.

1. APHIS issues **permits** for importation, interstate movement, or environmental release of certain genetically engineered (GE) organisms. Permit applications, which are carefully reviewed by APHIS scientists, provide details about the nature of the GE organism to be introduced and the conditions that will used to prevent the spread and establishment of the organism in the environment. APHIS issues permits for the introduction of GE organisms that pose a plant pest risk, including plants, insects, or microbes.
2. **Notification** is an administratively-streamlined alternative to the permit. The genetically engineered (GE) plant must meet specified eligibility criteria, and the introduction must meet certain pre-defined performance standards. APHIS now accepts notifications online through ePermits. Applicants are encouraged to use the ePermits system.
3. A person may petition APHIS to determine whether a regulated GE organism should no longer be regulated. The **petition** contains scientific information that APHIS evaluates, then allows for public input prior to making a decision. APHIS grants nonregulated status if the GE organism poses no more of a plant pest risk than an equivalent non-GE organism. If a regulated article is very similar to a GE organism that has already been granted nonregulated status, APHIS may extend nonregulated status to that organism. Nonregulated status means that permits and notifications are no longer required for introductions of this organism.

USDA-APHIS Biotechnology Regulatory Services
User's Guide

General Document Preparation Guidelines For Submission to BRS

v. 2/5/2008

Biotechnology Regulatory Services
Animal and Plant Health Inspection Service
United States Department of Agriculture

4700 River Road
Riverdale, MD 20737
(301) 734-7324

The information contained in this document is intended solely as guidance, and reflects APHIS' current interpretation of applicable statues and regulations. Except where noted, persons may choose to follow APHIS guidance or follow different procedures, practices, or protocols that meet applicable statutes and regulations.

Language implying that guidance is mandatory (e.g. "shall," "must," "required," or "requirement") should not be construed as binding unless the terms are used to refer to a statutory or regulatory requirement. Throughout the document, sections from applicable statutes and regulations are clearly identified in grey-shaded text boxes.

Conversely, following the guidelines contained in this document should not be construed as a guarantee of compliance with applicable statutes and regulations.

General Document Preparation Guidelines For Submission to BRS

Quick Guide to BRS Submissions
General Document Preparation Guidelines for Submission to BRS
Document Quality Guidelines
- General Text Formatting
- Scientific Names and Terminology
- References
- Tables
- Figures
- Equations
- Sequence Data
- Color Printing
- Media Type and Number of Copies

Data Quality Guidelines
- Data collection and experimental design
- Statistical methodology
- Statistically valid demonstration of equivalence

Confidential Business Information (CBI) in Submissions to BRS
- What is confidential business information?
- Letter of justification for claims of CBI
- Preparation of documents containing CBI

How to Find More Information

Quick Guide to BRS Submissions

Documents submitted to BRS are primarily related to four types of regulatory procedures that are discussed in detail in other guidance documents:

- Permits for the introduction of regulated articles
- Notification of the introduction of regulated articles
- Petitions to grant non-regulated status to a regulated article
- Extension of non-regulated status to a regulated article

Although the specific content of individual documents will vary based upon the type of submission, all documents submitted to BRS have some features in common.

- General formatting (p. 3-5)
    - Documents submitted to BRS should be of professional, publication quality.
    - Specific document preparation guidelines are provided in this document.
- Presentation of data and statistical analysis (p. 5-8)
    - Data and statistical analysis included in submissions must be of a sufficient caliber as for publication in a scientific peer reviewed journal.
    - Specific guidelines for presentation of data and statistical analysis are provided in this document.
    - Particular care must be taken in selecting statistical methods to demonstrate *equivalence*.
- Confidential business information (p. 8-10)
    - All documents submitted to BRS may be released to the public pursuant to a request under the Freedom of Information Act (FOIA).
    - Information determined to be "confidential business information" (CBI) is protected from public disclosure.
    - Applicants must submit a letter justifying any claims of CBI in submitted documents.
    - Submissions to BRS that include CBI must be formatted to protect this information from public disclosure by preparing an additional CBI-deleted version.

General Document Preparation Guidelines for Submission to BRS

Most documents submitted to BRS are associated with one of the four types of regulatory procedures discussed in detail other guidance documents:

- Permits for the introduction of regulated articles
- Notification of the introduction of certain regulated articles
- Petitions to grant non-regulated status to a regulated article
- Extension of non-regulated status to a regulated article

Each guidance document above includes sample documents related to a particular type of submission. Although the specific content of individual documents will vary based upon the submission type, all documents submitted to BRS have some features in common. This guidance document details basic guidelines for document preparation and formatting, presentation of statistical information, and handling of confidential business information.

Document Preparation Guidelines

All documents submitted to BRS should be of professional, publication quality, as if for submission to a peer reviewed scholarly journal. Language should be clear, well organized, and free of typographical and grammatical errors. Documents should generally follow standard formatting guidelines similar to those provided by most scientific journals.

Please use the following specific guidelines, where appropriate, for preparation of all documents submitted to BRS.

General Text Formatting

Format text in the body of the document for printing on standard U.S. letter-sized paper in portrait orientation. Use at least 1" margins on all sides of the text. Line spacing may be single or double. Use a 12-point font (for proportionally spaced type) or 10 characters/inch (4 characters/cm) if the letter spacing is uniform. Number all pages in the document sequentially beginning with the first page.

Divide long documents (such as petitions) into sections, and include Table of Contents, and Lists of Tables, Figures, etc.

Scientific Names and Terminology

Spell out all symbols, abbreviations and acronyms the first time they are used. Avoid use of abbreviations for gene, protein or other specialized names. Define (or avoid) all technical terms that may be familiar only to specialists.

The species name is required for all donor and recipient organisms. *Italicize* scientific names. Species name must be fully spelled out the first time it is mentioned in the text (e.g.

Lycopersicon esculentum), but may be abbreviated with the single-letter generic name thereafter (e.g. *L. esculentum*) as long as no confusion with other species results. Also, cite sub-species, cultivar, etc., where relevant. Do not use common and species names interchangeably, but common names may be used after scientific names are provided.

The first time an organism is introduced in the text, provide a brief description to clearly identify the organism; e.g. "*Cornus florida* L. (flowering dogwood), a small deciduous tree."

References

If references are cited in the text of a submission, presenting them in the text as (Author, Year) is preferable. The submission should also include a reference list that details reference author(s), date, article title, journal title, volume, and page number. Do not abbreviate journal titles. When conference proceedings or other books are cited, provide the publisher's name and location. See the American Medical Association for an example of an acceptable citation style:

http://www.liunet.edu/cwis/cwp/library/workshop/citama.htm.

Copies of literature cited need not be included with the submission. However, APHIS may request copies of literature cited if necessary.

Tables

Tables should supplement, not duplicate, the text. Number tables in the order of their citation in the text. Provide a short descriptive title at the top of each table; rather than simply repeating the labels on columns and rows of the table, the title should reveal the point of grouping certain data in the table. Statistical and other details should be provided as footnotes rather than appearing in the title. Tables should have footnotes for any abbreviations used in the table. Do not add vertical or horizontal lines to tables unless essential to avoid ambiguity. Do not repeat the same material in figures and tables; when either is equally clear, a figure is preferable. Do not include any class of information in tables that is not discussed in the text of the document.

Small tables may be embedded in the text. Larger tables should be presented on a separate page either following the first citation in the text, or at the end of the document or major section. If presented on separate page, a table may be in either portrait or landscape orientation.

Figures

Figures should be numbered sequentially, titled, and legends should be brief, self-sufficient explanations. The figure title (i.e., Figure 1) should be given as the first two words of the legend. Label graph axes with the parameter or variable measured, the units of measure, and the scale. Definitions of symbols should usually appear in the figure legend. Avoid the use of light lines and screen shading, instead use black-and-white, hatched and/or crosshatched designs for emphasis. Before submitting figures, please photocopy each one to verify that photocopied versions of the figures are as clear as the originals.

Include figures in the document following the guidelines for tables (see above).

Equations

Equations set separately from the text should be broken into two or more lines if they exceed the width of one column. Use leading zeroes with all numbers less than one, including probability values (e.g., $P < 0.001$).

Sequence Data

In general, nucleotide and amino acid sequences should be submitted only when the sequences are not already available in a public database. Short sequences should be included in the body of submissions only when necessary to illustrate a specific point. For example, amino acid sequence might be included in a figure to illustrate similarity to other amino acid sequences. Attach long stretches of sequence (greater than ~100 nucleotides or amino acids) as separate files in a standard sequence format. Applicants are encouraged to submit sequence data to public databases, such as those maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI), and provide APHIS with accession numbers.

Color Printing

The use of color in submissions is discouraged, unless color is an integral part of the image's meaning. Submissions are commonly reproduced in black and white, particularly when distributed to the public. In many cases, the use of color may be unavoidable (i.e. photographs). If color images are necessary, submit original full-color copies of the image with all required copies of the document. Color images should be clear and understandable when printed in black and white (e.g. when photocopied or printed in grayscale).

Media Type and Number of Copies

Acceptable media type (printed vs. electronic) and required number of copies varies depending upon the type of submission. See other guidance documents for information specific to each submission type. When printed documents are accepted, the original document should be printed on one side of U.S. letter-sized paper. Any required copies should be of a quality and clarity comparable to the original.

Where electronic media are accepted, submit all files on a single CD (if possible) formatted to be accessible on a computer with a Microsoft Windows operating system. In some cases, files may be submitted via e-mail. Acceptable file formats include Microsoft Word, Word Perfect, and Adobe pdf. See other guidance documents for information specific to each submission type.

Data Quality Guidelines

Any experiments performed by the submitter must follow certain guidelines in order to be used as supporting data in submissions to BRS. The amount of detailed information given is critical,

especially for petitions and extensions. Supporting data provided to APHIS is expected to be of the same scientific caliber as that published in peer reviewed journals.

In all submissions, fully describe experimental design, use of controls, and appropriate statistical methodology, in addition to concurring published data. Acknowledgement of opposing data and logical arguments against it should also be included. Note that for most submissions to BRS, federal regulations require disclosure of unfavorable evidence.

Data Collection and Experimental Design

Clearly describe sampling designs, experimental designs, data collection protocols, precision of measurements, sampling units, experimental units, and sample sizes. Where possible, include some measure of the precision of estimates— standard errors or confidence intervals— although this may not be necessary or possible in all instances, especially for unusual statistics.

Graphical data presentation is encouraged. Carefully composed graphs often permit the reader to decide at a glance if data are in danger of violating statistical assumptions.

Statistical Methodology

Authors are free to interpret statistical analyses as they see fit; however, documents must include information sufficient for an independent assessment of the author's analysis. Clearly state the assumptions and the model underlying any statistical analysis, and provide sufficient detail in the presentation of results.

Assumptions. Assumptions behind any statistical analysis must be articulated and well justified. Where unusual assumptions are made, unusual procedures are used, or unusual types of data are involved, provide sufficient information for an assessor to judge whether any departures from assumptions are severe enough to invalidate the conclusions. The amount of detail provided in any particular instance will depend on the centrality of the statistical test to the conclusions.

Reporting of analyses. Always state the specific statistical procedure used. If a statistics program or program package was used, a complete citation (including version number) should be given. If necessary, the author should indicate which procedure within a package was used, and which method within a procedure was chosen. Explain unusual statistical procedures in sufficient detail, including references if appropriate, for the reader to reconstruct the analysis. To denote levels of significance, actual P values are generally more informative than symbols such as * and **.

If conclusions are based on an analysis of variance or regression, information sufficient to permit the construction of the full analysis of variance table (at least degrees of freedom, the structure of F-ratios, and P values) must be presented or be clearly implicit. Where ambiguity is possible, the authors must indicate which effects were considered fixed or random and why.

Use of controls. In all experimental designs, use appropriate positive and negative control groups. Include control groups in tables and figures for comparison.

Statistically Valid Demonstration of Equivalence

Much of the data submitted to BRS is used to argue the *equivalence* of a transgenic variety and a non-transgenic comparator. This is particularly true for petitions to grant non-regulated status, in which the petitioner presents evidence that a transgenic organism is no more likely to pose a plant pest risk than the unmodified organism from which it was derived.

In support of this, many applicants submit data that, in their view, demonstrates that the agronomic and compositional properties of a transgenic line are statistically similar to a non-transgenic line. Applicants often base a conclusion of equivalence upon statistical methods designed to detect statistical *differences*, using an argument as follows:

- The null hypothesis is that there is no difference between two lines.
- The statistical test evaluates the probability of finding the observed difference between the lines by chance alone, given that the null hypothesis is true.
- If the difference *is* statistically significant—that is, the difference is unlikely to have been observed by chance— then it seems clear that the two lines *are not* equivalent.
- If the difference *is not* statistically significant, it seems to make sense to conclude that the two lines *are* equivalent.

This last conclusion is often used to support the interpretation the variable measured is equivalent between the transgenic and non-transgenic lines.

This approach, however, is **statistically invalid** and leads to invalid conclusions. If this kind of test reaches the conclusion of "no statistically significant difference," it means the current evidence is not strong enough to demonstrate that the two lines are different; this is not the same as demonstrating that the two lines are the same. The procedure establishes evidence against the null hypothesis only, not for it. In other words, the absence of evidence is not evidence of absence.

A small sample size, for example, can make it difficult to detect statistical significance of a difference. If the goal is to establish equivalence, following the flawed methodology above one would just run the experiment with few samples or replicates. Furthermore, problems with the data itself (e.g. outliers), may hamper the ability to find a result at the specified significance level, and so again one could come to a conclusion of equivalence as a result of poor data.

Statistical methods are readily available to determine whether two groups are *statistically equivalent*, and should be used accordingly. Equivalence tests begin with the null hypothesis that two samples are *different*, and seek evidence to reject that hypothesis. For more information on statistical methods of equivalence testing, see:

- M. Clark (2005) *Equivalence Tests*, available online at http://www.unt.edu/benchmarks/archives/2005/february05/rss.htm
- *Statistical Tests for Equivalence*, online at http://www.graphpad.com/library/BiostatsSpecial/article_182.htm

Confidential Business Information (CBI) in Submissions to BRS

All documents submitted to BRS are subject to the Freedom of Information Act (FOIA), which requires that records submitted to federal agencies be made available to the public. BRS provides the public with documents it receives when formally requested through the APHIS FOIA office. Additionally, BRS voluntarily makes many submitted documents freely available on its website (http://www.aphis.usda.gov/brs/). Section (b)(4) of the FOIA, however, exempts from disclosure certain types of information related to trade secrets and commercial or financial information, collectively referred to as *confidential business information* (CBI). Documents submitted to BRS that contain CBI require special handling.

What is confidential business information (CBI)?

Information that would be protected from disclosure under section (b)(4) of the FOIA is classified as confidential business information (CBI). This includes trade secrets and commercial or financial information found to be confidential.

A *trade secret* is information relating to the production process, including production data, formulas, and processes, and quality control tests and data, as well as research methodology and data generated in the development of the production process. Such information must be (1) commercially valuable, (2) used in one's business and (3) maintained in secrecy.

Commercial or financial information may be deemed confidential if review establishes that the applicant faces active competition in the area to which the information relates and that substantial competitive harm would result from disclosure. Information such as safety data, efficacy or potency data, and environmental data may be such confidential information.

If an applicant believes a document to be submitted to BRS contains confidential business information, upon submission the applicant must:

1) provide a detailed letter justifying any claims of CBI found in the document, and
2) include both CBI-containing and CBI-deleted versions of the document.

Letter of justification for claims of CBI

If an applicant believes that a document to be submitted to BRS contains confidential business information, the applicant must include a letter justifying all claims of CBI. The letter must be detailed enough to demonstrate that *each piece of information claimed as CBI* meets the definitions of trade secret or commercial or financial information, as described above. Claims of

CBI must be justified in terms related to competitive harm due to its release. Information is not protected from disclosure simply because the applicant does not want the information to be made public.

The following are examples of information often reasonably justified as CBI in submissions to BRS:

- donor organism
- gene name and description
- phenotype
- transformation method
- amount shipped or acreage planted
- specific addresses of field sites
- names and institutions of collaborators

The following kinds of information are not typically considered CBI, but in exceptional cases might be claimed as CBI with a strong and legitimate justification:

- names and addresses of responsible parties
- organization
- recipient organism
- phenotypic category
- county
- state

Additionally, information which is published or otherwise publicly available may not be claimed as CBI. BRS reserves the right to accept, challenge, or request further information on each claim of CBI.

Preparation of documents containing CBI

If a document to be submitted to BRS contains information that the applicant claims as CBI, the applicant must submit two versions of the document: a complete version containing CBI (the "CBI Copy") and an edited version with the CBI redacted (the 'CBI-deleted Copy"). Use the following guidelines to prepare these two documents.

- Each page of a document containing CBI must have "CBI Copy" marked in the upper right corner. Each page of a CBI-redacted document must have "CBI-deleted Copy" marked in the upper right corner.
- In a document containing CBI, mark with square brackets only the specific words or phrases claimed as CBI, and in the right margin for each set of brackets write "CBI." In the CBI-deleted version, replace with blank spaces the words or phrases marked in the CBI version, mark the spaces with square brackets, and in the right margin for each set of brackets write "CBI-deleted."

- The CBI-deleted version should be identical to the CBI version, except 1) blank spaces surrounded by square brackets occurring in the text where the CBI text has been redacted and 2) "CBI-deleted Copy" should appear in the upper right corner of each page instead of "CBI Copy."
- The CBI-deleted version must be paginated identically to the CBI copy. The CBI-deleted version should be made directly from the same document which originally contained CBI.
- If several consecutive pages are CBI-deleted, a single page designating the numbers of deleted pages may be substituted for those pages (for example, "Pages 7 through 10 have been CBI-deleted.").
- Do not insert additional text (transitions, paraphrasing, or generic substitutions, etc.) into the spaces of the CBI-deleted version.
- All published references that appear in the CBI copy should be included in the reference list of the CBI-deleted copy.

How to Find More Information

For information related to submission of specific documents to BRS, please refer to the contact information listed within the corresponding guidance document:

- Permits for the introduction of regulated articles
- Notification of the introduction of certain regulated articles
- Petition to grant non-regulated status to a regulated article
- Extension of non-regulated status to a regulated article

If you would like more information about confidential business information in BRS submissions, please contact:

Document Control Officer
USDA-APHIS-BRS
4700 River Road, Unit 91
Riverdale, Maryland 20737
(301) 734-0667 or (301) 734-7324

To request a copy of BRS documents under the Freedom of Information Act, please contact:

FOIA Officer
USDA-APHIS
4700 River Road, Unit 50
Riverdale, MD 20737-1232
(301) 734-5267

Document Preparation Guidelines

Version History

1/16/2007	Original draft.
11/20/2007	Reformatting to remove references to chapter organization of *BRS User's Guide*
2/5/2008	Removal of word "draft" from document.

USDA-APHIS Biotechnology Regulatory Services
User's Guide

Notification

v. 2/5/2008

Biotechnology Regulatory Services
Animal and Plant Health Inspection Service
United States Department of Agriculture

4700 River Road
Riverdale, MD 20737
(301) 734-7324

The information contained in this document is intended solely as guidance, and reflects APHIS' current interpretation of applicable statues and regulations. Except where noted, persons may choose to follow APHIS guidance or follow different procedures, practices, or protocols that meet applicable statutes and regulations.

Language implying that guidance is mandatory (e.g. "shall," "must," "required," or "requirement") should not be construed as binding unless the terms are used to refer to a statutory or regulatory requirement. Throughout the document, sections from applicable statutes and regulations are clearly identified in grey-shaded text boxes.

Conversely, following the guidelines contained in this document should not be construed as a guarantee of compliance with applicable statutes and regulations.

Notification

Quick Guide to Notification
Notification for the Introduction of Certain Regulated Articles
Qualifying for the Notification Process
    Eligibility Criteria
    Performance Standards
Procedural Requirements for Notifying APHIS
    Information to Include in a Notification
    Design Protocols
    Confidential Business Information in a Notification
    How to Submit a Notification
    Changes to a Notification after Submission
What to Expect After Notifying APHIS
    APHIS Review and Acknowledgement
    Effective Dates of Acknowledged Notification
    Notification of Unusual Circumstances
    Inspections
    Field Test Report
    Planting Report
How to Find More Information

Additional Materials
    Sample Interstate Movement Notification
    Sample Import Notification
    Sample Environmental Release Notification

Version History

Quick Guide to Notification

Notification is an administratively streamlined alternative to the permit process to allow the introduction of a certain subset of genetically engineered plants.

- The goal of the notification procedure is the same as the permit system: *preventing the unintended release of the regulated article*.
- Introductions of genetically engineered *plants* may use the notification procedure if:
  - The introduced plant meets **all** of six eligibility criteria (p. 7) AND,
  - The introduction (the importation, interstate movement, or environmental release) will meet **all** of six performance standards (p. 10).
  - Design protocols articulate how the applicant intends to meet the required performance standards (p. 20).
- By submitting a notification to APHIS, the applicant certifies to APHIS that the introduction will meet both specified eligibility criteria and performance standards.
  - The submission document contains information that helps APHIS determine the appropriateness of the notification process for the proposed introduction (p. 16).
  - Notification should be submitted to APHIS:
    - At least 10 days prior to an interstate movement of a regulated article, or
    - At least 30 days prior to an importation or environmental release of a regulated article
- APHIS sends copies of the notification to state regulatory officials for review in each state where the introduction has been proposed (p. 22).
- If APHIS agrees that the introduction meets eligibility criteria and performance standards, APHIS will send a letter of acknowledgement to the applicant:
  - Within 10 days of receipt of a notification of interstate movement, or
  - Within 30 days of receipt of a notification of importation or environmental release.
- Introductions *may not proceed* without a letter of acknowledgement from APHIS.
- Applicants must promptly notify APHIS of any unusual occurrences that happen during the introduction (p. 25).
- All introductions are subject to inspection by federal and/or state inspectors (p. 26).
- A field test report must be submitted to APHIS within 6 months of the termination of an environmental release (p. 28).

The notification procedure is explained in 7 C.F.R. 340.3:

"Sec. 340.3 Notification for the introduction of certain regulated article.[5]

(a) General. Certain regulated articles may be introduced without a permit, provided that the introduction is in compliance with the requirements of this section. Any other introduction of regulated articles require a permit under Sec. 340.4, with the exception of introductions that are conditionally exempt from permit requirements under Sec. 340.2(b) of this part.

(b) Regulated articles eligible for introduction under the notification procedure. Regulated articles which meet all of the following six requirements and the performance standards set forth in paragraph (c) of this section are eligible for introduction under the notification procedure.

(1) The regulated article is any plant species that is not listed as a noxious weed in regulations at 7 CFR part 360 under the Plant Protection Act (7 U.S.C. 7712), and, when being considered for release into the environment, the regulated article is not considered by the Administrator to be a weed in the area of release into the environment.

(2) The introduced genetic material is ``stably integrated'' in the plant genome, as defined in Sec. 340.1.

(3) The function of the introduced genetic material is known and its expression in the regulated article does not result in plant disease.

(4) The introduced genetic material does not:

(i) Cause the production of an infectious entity, or

(ii) Encode substances that are known or likely to be toxic to nontarget organisms known or likely to feed or live on the plant species, or

(iii) Encode products intended for pharmaceutical or industrial use.

(5) To ensure that the introduced genetic sequences do not pose a significant risk of the creation of any new plant virus, plant virus-derived sequences must be:

(i) Noncoding regulatory sequences of known function, or

(ii) Sense or antisense genetic constructs derived from viral genes from plant viruses that are prevalent and endemic in the area where the introduction will occur and that infect plants of the same host species, and that do not encode a functional noncapsid gene product responsible for cell-to-cell movement of the virus.

(6) The plant has not been modified to contain the following genetic material from animal or human pathogens:

(i) Any nucleic acid sequence derived from an animal or human virus, or

(ii) Coding sequences whose products are known or likely causal agents of disease in animals or humans.

(c) Performance standards for introductions under the notification procedure. The following performance standards must be met for any introductions under the notification procedure.

(1) If the plants or plant materials are shipped, they must be shipped in such a way that the viable plant material is unlikely to be disseminated while in transit and must be maintained at the destination facility in such a way that there is no release into the environment.

(2) When the introduction is an environmental release, the regulated article must be planted in such a way that they are not inadvertently mixed with non-regulated plant materials of any species which are not part of the environmental release.

[5]APHIS may issue guidelines regarding scientific procedures, practices, or protocols which it has found acceptable in making various determinations under the regulations. A person may follow an APHIS guideline or follow different procedures, practices, or protocols. When different procedures, practices, or protocols are followed, a person may, but is not required to, discuss the matter in advance with APHIS to help ensure that the procedures, practices, or protocols to be followed will be acceptable to APHIS."

Sec. 340.3 Notification for the introduction of certain regulated article (cont'd)

(c) *continued…*

"(3) The plants and plant parts must be maintained in such a way that the identity of all material is known while it is in use, and the plant parts must be contained or devitalized when no longer in use.

(4) There must be no viable vector agent associated with the regulated article.

(5) The field trial must be conducted such that:

(i) The regulated article will not persist in the environment, and

(ii) No offspring can be produced that could persist in the environment.

(6) Upon termination of the field test:

(i) No viable material shall remain which is likely to volunteer in subsequent seasons, or

(ii) Volunteers shall be managed to prevent persistence in the environment.

(d) Procedural requirements for notifying APHIS. The following procedures shall be followed for any introductions under the notification procedure:

(1) Notification should be directed to the Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine, Biotechnology and Scientific Services, Biotechnology Permits, 4700 River Road, Unit 147, Riverdale, Maryland 20737-1237.

(2) The notification shall include the following:

(i) Name, title, address, telephone number, and signature of the responsible person;

(ii) Information necessary to identify the regulated article(s), including:

(A) The scientific, common, or trade names, and phenotype of regulated article,

(B) The designations for the genetic loci, the encoded proteins or functions, and donor organisms for all genes from which introduced genetic material was derived, and

(C) The method by which the recipient was transformed;

(iii) The names and locations of the origination and destination facilities for movement or the field site location for the environmental release; and the size of the introduction,

(iv) The date and, in the case of environmental release, the expected duration of the introduction (release); and

(v) A statement that certifies that introduction of the regulated article will be in accordance with the provisions of this section.

(3) Notification must be submitted to APHIS:

(i) At least 10 days prior to the day of introduction, if the introduction is interstate movement.

(ii) At least 30 days prior to the day of introduction, if the introduction is an importation.

(iii) At least 30 days prior to the day of introduction, if the introduction is an environmental release.

(4) Field test reports must be submitted to APHIS within 6 months after termination of the field test. Field test reports shall include the APHIS reference number, methods of observation, resulting data, and analysis regarding all deleterious effects on plants, nontarget organisms, or the environment.

(5) The Administrator, shall be notified of any unusual occurrence within the time periods and in the manner specified in Sec. 340.4(f)(10).

(6) Access shall be allowed for APHIS and State regulatory officials to inspect facilities and/or the field test site and any records necessary to evaluate compliance with the provisions of paragraphs (b) and (c) of this section.

(e) Administrative action in response to notification.

(1) APHIS will provide copies of all notifications to appropriate State regulatory official(s) for review within 5 business days of receipt. Comments to APHIS from appropriate State regulatory officials in response to notifications for interstate movement of regulated articles will not be required by APHIS prior to acknowledgment, although States may provide their reviews to APHIS at their discretion.

Sec. 340.3 Notification for the introduction of certain regulated article (cont'd)

(e) *continued…*

(2) The Administrator, will provide acknowledgement within 10 days of receipt that the interstate movement is appropriate under notification.

(3) The Administrator, will provide acknowledgement within 30 days of receipt that the importation is appropriate under notification.

(4) APHIS will provide acknowledgment within 30 days of receipt that the environmental release is appropriate under notification. Such acknowledgment will apply to field testing for 1 year from the date of introduction, and may be renewed annually by submission of an additional notification to APHIS.

(5) A person denied permission for introduction of a regulated article under notification may apply for a permit for introduction of that regulated article without prejudice."

Notification for the Introduction of Certain Regulated Articles

Notification is an alternative to the permit process for the introduction (interstate movement, importation, or environmental release) of certain genetically engineered plants that are regulated articles. Importation means moving regulated articles from a foreign country into the United States; whereas, interstate movement means moving the regulated articles from one U.S. State to another. To make use of the notification procedure, you must be introducing a plant species that meets all of six eligibility criteria, and you must introduce it in accordance with specified performance standards.

Introduce or introduction: To move into or through the United States, to release into the environment, to move interstate, or any attempt thereat (§ 340.1).

A notification is a document sent to APHIS from the party who plans to introduce a regulated article, which certifies that the introduction will meet the required eligibility and performance standards. APHIS reviews the notification for appropriateness of the proposed introduction under the notification process. If APHIS agrees that the introduction does not require a permit, APHIS will acknowledge receipt of the notification within 10-30 days, depending upon the type of introduction. Introductions *may not proceed* without a letter of acknowledgement from APHIS.

Notification is an administratively streamlined procedure to facilitate introductions of regulated articles with which APHIS has a great deal of familiarity. This familiarity gives APHIS confidence that the regulated article will not be released beyond the proposed introduction (both in time and space) if the responsible party certifies that specified criteria will be met. However, the ultimate goal of both the notification and permit systems is identical: *preventing the unintended release of the regulated article*.

Most applicants who wish to introduce regulated articles use the notification procedure. In 2005, APHIS acknowledged 1313 introductions under the notification process; in the same period, APHIS granted 97 permits.

Please note that other Federal and State plant quarantine laws may restrict or prohibit the interstate movement, importation, or release of the regulated article. Further, although a pathogen-resistant plant variety may be eligible for introduction under the notification procedure, introduction of the *pathogen* may still require additional permits (e.g. challenge-inoculation experiments of resistant plants). It is the applicant's responsibility to obtain any additional permits required by Federal and State law. For more information on Federal quarantine laws, visit APHIS Plant Protection and Quarantine: http://www.aphis.usda.gov/ppq/index.html. The National Plant Board provides information about State-level quarantine laws: http://nationalplantboard.org/laws/index.html.

History of the Notification Process
Beginning with the Coordinated Framework in 1986, APHIS oversaw introductions of regulated articles by granting permits. In 1993 APHIS introduced the notification procedure as a streamlined alternative to permitting for crops with which APHIS had developed familiarity. At first, notifications were limited to six crops: corn, cotton, potato, soybean, tobacco, and tomato. In 1997 APHIS expanded the notification process to include many other plant species.

Qualifying for the Notification Process

Only introductions of genetically engineered *plants* are eligible for the notification process. Genetically engineered insects, nematodes, bacteria, viruses and other regulated organisms do not qualify for notification; a permit application must be submitted for introductions of these organisms. Further, because the duration of a release under notification is limited to one year, environmental releases of most perennial and biennial plant species must be authorized under a permit, unless the release will be fully terminated within one year.

To qualify for the notification process, the applicant must certify that: 1) the regulated article meets specific **Eligibility Criteria**; and 2) the introduction will meet specified **Performance Standards**. If the regulated article does not meet all of the eligibility requirements or all of the performance standards cannot be met, the introduction may still be allowed under a permit. Eligibility criteria and performance standards for notifications are outlined below.

Eligibility Criteria

In order to introduce a regulated article under the notification procedure, the regulated article must meet all of the six eligibility criteria described below. Eligibility criteria are characteristics of the regulated article (i.e. the plant) and the introduced genetic material.

If you have questions about whether a proposed introduction will meet all six eligibility criteria, contact APHIS as far in advance of the proposed introduction as possible. Introductions that do not meet all six eligibility criteria may still be eligible for introduction under a permit, but the approval of a permit may take longer than notification.

The eligibility criteria are:

1. Recipient organism is not listed as a noxious weed nor considered by APHIS to be a weed in the area of release

> "The regulated article is any plant species that is not listed as a noxious weed in regulations at 7 CFR part 360 under the Plant Protection Act (7 U.S.C. 7712), and, when being considered for release into the environment, the regulated article is not considered by the Administrator to be a weed in the area of release into the environment." (§ 340.3(b)(1))

Most common crops meet this eligibility criterion. Plant species listed as noxious weeds in 7CFR360 are not eligible for notification. Additionally, if the plant species may be *considered* a weed in the area of release—a judgment made by the APHIS Administrator, usually in

collaboration with state agricultural officials— the introduction will not be eligible for notification.

Note that the 'considered to be a weed' clause only applies to notifications of release into the environment, and *not* notifications of importation or interstate movement. If there is any question that the engineered plant could be considered a weed in the area of release, contact APHIS as far in advance of the proposed introduction as possible.

2. Stable integration of genetic material

> "The introduced genetic material is 'stably integrated' in the plant genome, as defined in Sec. 340.1." (§ 340.3(b)(2))

> **Stably Integrated.** The cloned genetic material is contiguous with elements of the recipient genome and is replicated exclusively by mechanisms used by recipient genomic DNA (§ 340.1).

The DNA may be inserted into any part of the genome of the plant including nuclear, mitochondrial or chloroplast genomes. The method of transformation must result in a stable integration. Vectors that can mobilize or replicate naturally would not be considered to be a stable transformation. Crosses designed to mobilize, alter or replicate (i.e. increase copy number) stably inserted cloned genetic material are not eligible for notification. However, field experiments using these constructs in their stable form do meet this eligibility requirement.

3. Known function of genetic material that does not result in plant disease

> "The function of the introduced genetic material is known and its expression in the regulated article does not result in plant disease." (§ 340.3(b)(3))

The intent of this criterion is to exclude the use of introduced genetic material that would result in plant disease. This criterion excludes many sequences expressing pathogenesis-related proteins. This also requires that the applicant knows enough about the function of the genetic material to assert that it does not cause plant disease.

To make the assertion that an inserted sequence is unlikely to result in plant disease, the function of the inserted material in the plant must have been determined by empirical observation, or inferred from a high degree of sequence similarity to sequences with an empirically determined function. This criterion excludes, for example, nucleotide sequences whose sole identification or characterization is based upon expression in response to a particular chemical or physical stimulus. The criterion also excludes experiments in which random clones of unknown function have been inserted (e.g. cosmid or cDNA library screening experiments).

4. Characteristics of gene and gene product

> "The introduced genetic material does not: (i) Cause the production of an infectious entity, or (ii) Encode substances that are known or likely to be toxic to nontarget organisms known or likely to feed or live on the plant species, or (iii) Encode products intended for pharmaceutical or industrial use." (§ 340.3(b)(4))

This criterion has three components. The first ensures that the plant has not been modified to produce an infectious entity, such as a plant virus, an animal virus, a human virus, or other infectious entities. This criterion does *not* exclude use of genetic materials from infectious entities per se, so long as a complete infectious entity cannot be produced.

The second component prevents introductions of plants that are likely to be toxic to organisms living or feeding on the plants. Plants that are designed to be toxic to some organisms— the 'target organisms'—are *not* excluded (for example, plants producing *Bt* toxins). This also allows the introduction of plants that may be toxic to nontarget organisms that are *not* likely to feed or live on the introduced plant, i.e. organisms that are not associated with the plant during the field trial.

Finally, the plant must not express compounds intended for pharmaceutical or industrial use. These plants always require a permit.

Plants are considered to express compounds intended for pharmaceutical use if commercialization of the compound would require approval of one of the following agencies:

(1) FDA's Center for Biologics Evaluation and Research (human biologics);
(2) FDA's Center for Drug Evaluation and Research (human drugs);
(3) FDA's Center for Veterinary Medicine (animal drugs); or
(4) USDA's Center for Veterinary Biologics (animal biologics).

Plants that meet the following three criteria are considered to produce industrial compounds:

(1) The plants are engineered to produce compounds that are new to the plant;
(2) The new compound has not been commonly used in food or feed; and
(3) The new compound is being expressed for non-food, non-feed industrial uses. Industrial uses include, but are not limited to, detergent manufacturing, paper production, and mineral recovery.

Plants engineered for *tolerance* to heavy metals and which are to be used in agricultural production are not excluded from the notification process by this criterion. However, plants that *accumulate* or *detoxify* soil contaminants and are not intended for food or feed use require a permit.

5. Does not pose significant risk of creating new plant viruses.

> "To ensure that the introduced genetic sequences do not pose a significant risk of the creation of any new plant virus, plant virus-derived sequences must be: (i) Noncoding regulatory sequences of known function, or (ii) Sense or antisense genetic constructs derived from viral genes from plant viruses that are prevalent and endemic in the area where the introduction will occur and that infect plants of the same host species, and that do not encode a functional noncapsid gene product responsible for cell-to-cell movement of the virus." (§ 340.3(b)(5))

The intent of this criterion is to prevent the creation of new plant viruses that might result from recombination of the introduced genetic material with genetic material from endemic viruses. Introduced sequences derived from plant viruses must be *either* noncoding sequence *or* sequences that are 1) from viruses prevalent and endemic in the same plant species in the proposed area of introduction and 2) do not encode a functional cell-to-cell movement protein. Eligible non-coding sequences include promoters, enhancers, introns with enhancer activity, upstream activating sequences, polyadenylation signals, transcription terminators, or other known regulatory sequences. In addition to anti-sense constructs, eligible constructs also include those using other mechanisms of RNA-mediated gene silencing of virus genes.

6. Does not contain sequences from human or animal pathogens

> "The plant has not been modified to contain the following genetic material from animal or human pathogens: (i) Any nucleic acid sequence derived from an animal or human virus, or (ii) Coding sequences whose products are known or likely causal agents of disease in animals or humans." (§ 340.3(b)(6))

Plants containing any nucleic acid sequence derived from an animal or human virus are not eligible for notification (*e.g.*, hemagglutinin components derived from human influenza virus). In addition, plants containing coding sequences whose products are known or likely causal agents of disease in humans or nontarget animals are not eligible (*e.g.*, expression of cholera toxin A). Under a separate statutory authority, APHIS cannot acknowledge notifications involving select agents, genes from select agents, or toxins produced by select agents. For more information on select agents, visit: http://www.aphis.usda.gov/programs/ag_selectagent/index.html

Performance Standards

The performance standards are a set of six conditions that must be met in order to ensure that the regulated article is introduced in such a way that it is not inadvertently released beyond the proposed introduction, allowing it to persist in the environment. Generally, performance standards are characteristics associated with the act of introduction (importation, interstate movement, or environmental release).

The goal of performance standards is to manage the introduced regulated article such that it or its offspring are unlikely to persist in the environment. The applicant is given flexibility in developing protocols appropriate to the introduction. However, in the notification the applicant *certifies* that the performance standards will be met (see **Information to Include in a**

Notification: 9. Certification below), and is legally responsible for meeting those standards regardless of the methods selected.

If you have questions about whether a proposed introduction will meet all six performance standards, please contact APHIS before beginning the notification process. Applicants are encouraged to discuss with APHIS any relevant biological considerations associated with particular plant species that may affect the ability to meet performance standards.

Introductions that do not meet all six eligibility criteria may still be eligible for introduction under a permit. Additionally, the guidelines for environmental releases under permit, described in other guidance documents, may be helpful in meeting the performance standards for notifications.

The required performance standards are:

1. Shipping and maintenance at destination

> "If the plants or plant materials are shipped, they must be shipped in such a way that the viable plant material is unlikely to be disseminated while in transit and must be maintained at the destination facility in such a way that there is no release into the environment." (§ 340.3(c)(1))

Plant materials shipped under the notification procedure must be packaged to ensure that plant material is unlikely to be released from the shipping container in transit. The shipping container requirements described in 7 CFR 340.8 or similar shipping methods are sufficient to meet this performance standard. However, note that movements under notification are *not* required to follow the container regulations in 7 CFR 340.8.

APHIS does not regulate the use of transgenic organisms in contained facilities, and does not evaluate the adequacy of research and storage facilities to prevent release into the environment. However, unauthorized releases of transgenic material from such facilities are a violation of APHIS regulation. APHIS strongly encourages applicants to ensure that destination facilities follow containment guidelines established by the National Institutes of Health or other similar protocols.

For more information about contained facilities, see:

- *Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules* (National Institutes of Health): http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines/guidelines.html
- *Practical Guide to Containment— Greenhouse Research with Transgenic Plants and Microbes* (Information Systems in Biotechnology, Virginia Tech): http://www.isb.vt.edu/cfdocs/greenhouse_manual.cfm

2. Inadvertent mixing of materials in environmental releases.

> "When the introduction is an environmental release, the regulated article must be planted in such a way that they are not inadvertently mixed with non-regulated plant materials of any species which are not part of the environmental release." (§ 340.3(c)(2))

Inadvertent mixing of regulated material and nonregulated material can usually be prevented by planting the regulated article in a defined area with an unplanted alley or other easily distinguishable zone between it and any other material. These areas should not be planted with a species that will be harvested or that is sexually compatible with the regulated article. Alleys between the transgenic field plot and neighboring plots should be sufficient to allow movement of planting and harvesting equipment and other farm implements in such a way that seed or vegetative propagules do not become deposited outside of the transgenic field test site and mixed with plant species that are not part of the field trial. Farm implements that can retain viable seed or other propagules should be cleaned on the transgenic field test site or otherwise treated to meet the performance standards. Persons granted access to the test site should be made aware of any protocols used to meet the performance standards, to ensure that their actions at the site will be consistent with those requirements.

This performance standard is also intended to prevent pollination of sexually compatible crops that may be within pollination distance of the field trial. The issue of pollen movement is discussed more fully under Performance Standard 5.

3. Maintaining identity and devitalization.

> "The plants and plant parts must be maintained in such a way that the identity of all material is known while it is in use, and the plant parts must be contained or devitalized when no longer in use." (§ 340.3(c)(3))

This performance standard ensures that the regulated articles are clearly identified at all times so that they are not inadvertently confused with other plant materials, and to ensure that they are either destroyed or contained after the duration of the introduction.

Identity of transgenic materials may be maintained with adequate labeling, record keeping, and by planting transgenic plants in distinct plots. See also Performance Standard 2 for more guidelines on preserving the identity of regulated material in the field.

Methods of final disposition and devitalization might include:

- Harvest of all seed, ears, tubers, or other reproductive material for transport to devitalization or containment facilities
- Incorporation of all remaining vegetative material at the test site into the soil for decomposition or above-ground composting
- Treatment of the remaining vegetative material with an appropriate registered herbicide

- In the case of woody perennial species, trees, and vines, removal of the plants to a contained facility or cutting and mulching, chipping or exposing the plants to high temperature treatment (i.e., autoclaving, oven baking, or incineration, in accordance with local regulations) and ensuring that any underground plant parts capable of reproduction are removed and likewise destroyed.
- For plants allowed to set seed during the field trial, the occurrence and duration of seed dormancy are factors that should also be considered in the design of proper monitoring protocols. For example, some hard seeds may not be destroyed by fumigation.

Plant materials that are not destroyed after the duration of the introduction must be removed to a contained facility to prevent further unauthorized release. The identity of stored seeds and propagative plant parts should continue to be labeled and maintained in such a way that persons handling these materials will know that subsequent introductions require APHIS authorization. See Performance Standard 1 for guidelines on contained facilities.

4. Elimination of viable vector agents.

> "There must be no viable vector agent associated with the regulated article." (**§** 340.3(c)(4))

When the transformation vector agent involved is a live microorganism, such as *Agrobacterium tumefaciens*, the transformed tissue should be free of the bacterium at the time of introduction. Acceptable elimination of the bacterium can be accomplished by treatment of the plant material with appropriate antibiotics.

5. Persistence in the environment.

> "The field trial must be conducted such that: (i) The regulated article will not persist in the environment, and (ii) No offspring can be produced that could persist in the environment." (**§** 340.3(c)(5))

The fifth performance standard is the test that most often determines whether APHIS will allow an introduction under the notification procedure or permit. Plant species having characteristics that make it more likely to persist without human intervention are less likely to be eligible for notification, but may still be eligible for release under a permit.

> **Persistence in the environment.** Producing feral or sustained populations of the regulated article or its offspring that can persist in agricultural or nonagricultural habitats without human intervention. (58 FR 17044,17049).

Introductions of plant species that have "weedy" characteristics may not be able to meet this performance standard. These characters *may* include: abundant seed production and dispersal; seed dormancy or long term seed viability in the soil; reproduction via vegetative structures; rapid population establishment; adaptation for long-distance dispersal (wind, water, animals, etc.); existence of feral populations of non-transgenic plants; individuals found in disturbed habitats.

When the applicant is considering certain crops that contain any of the above characteristics—particularly grasses, trees, and other woody perennials—the applicant should contact BRS and discuss the performance standards before submitting a notification to BRS.

To minimize the likelihood that seed or vegetative propagules are dispersed from an environmental release and create persistent populations, the applicant should consider the following:

- Dispersal mechanisms of seed or vegetative propagation (natural or accidental)
- Whether the site is near waterways or in an area prone to flooding
- Range of possible dispersal
- Likelihood of seed or propagule survival within the range of possible dispersal
- Methods adequate to prevent such dispersal, including appropriate security measures if appropriate
- Ability to monitor for, identify, and destroy any dispersed plants or their progeny

If seeds or propagules are likely to be dispersed long distances (such as by wind or animals), it may be necessary to prevent seed set or to use bagging, netting, or other methods sufficient to prevent dispersal.

If viable pollen may be produced by the regulated plants, the applicant should consider the following:

- Whether the plant is self-pollinating or outcrossing
- The extent and distance of pollen dissemination by wind and/or pollinating insects, birds, or other species, and the occurrence of these species in the area
- The ability of the plant species to produce viable, fertile progeny with sexually compatible wild, weedy, or feral relatives, and their distribution within the range of pollination
- Synchrony of the flowering cycle of the regulated plants with other sexually compatible relatives within the range of pollination
- The ability of hybrid progeny to persist in the environment
- Any precautions that may be taken to minimize pollen movement (such as flower bagging, border rows, male sterility, etc.)
- Any precautions that may be taken to prevent persistence of hybrids in the environment (such as removal or destruction of wild relatives in the area)

In general, the isolation distances for foundation seed production published by the Association of Official Seed Certifying Agencies (AOSCA) should be considered a minimum acceptable distance between the regulated plants and any sexually compatible species. Local seed certification rules may impose greater distances. More stringent methodologies may also be necessary for the applicant to ensure that no progeny will be produced that can persist in the environment.

Isolation distance standards are published in AOSCA's "Yellow Book," which is only available online to members. However, seed isolation distances based upon AOSCA standards for most common crops are published in 7 CFR 201.76, Regulations of the Federal Seed Act.

In most cases, pollen movement from the regulated plants to nearby *cultivated* sexually compatible crop species does not strictly meet the definition of "persistence in the environment," because the resulting hybrid progeny would not reproduce without human intervention. However, hybridization of the regulated article with non-regulated plants *does* violate Performance Standard 2. Therefore, the guidelines in this section to limit pollen movement to wild relatives should also be applied to prevent pollen movement to cultivated relatives.

6. No volunteer plants.

> "Upon termination of the field test: (i) No viable material shall remain which is likely to volunteer in subsequent seasons, or (ii) Volunteers shall be managed to prevent persistence in the environment." (§ 340.3(c)(6))

Volunteers should be minimized by growing transgenic material in defined areas in the field and by using adequate termination protocols (see Performance Standard 3). The use of stakes, markers, or GPS coordinates to define the area where the transgenic plants were grown may help in identifying volunteers for later elimination. Applicants should have monitoring protocols of adequate duration to ensure that all volunteers have been eliminated by the methods described in the sections above, including those volunteers that may emerge outside of the field plot (e.g. into fallow zones or adjacent fields). See also Performance Standard 5 above.

Procedural Requirements for Notifying APHIS

A notification is a document sent to APHIS from the party introducing the regulated article that certifies that the introduction will meet required eligibility criteria and performance standards. APHIS first reviews the notification for completeness, and then sends copies to appropriate State regulatory officials for review. If the introduction is appropriate for the notification process, APHIS then sends an *acknowledgement letter* to the responsible party named in the notification. Introductions *may not proceed* without a letter of acknowledgement from APHIS.

To notify APHIS of an interstate movement of a regulated article, notification must be submitted *at least ten days prior* to the proposed day of movement. To notify APHIS of an importation or environmental release of a regulated article, notification must be submitted *at least 30 days prior* to the proposed day of importation or release.

> In April 2006, APHIS introduced the *e-Permits* system for electronic submission of notification. Applicants are encouraged to send notification to APHIS electronically using this method. For instructions, visit: http://www.aphis.usda.gov/permits/brs_epermits.shtml

One notification may include multiple plant lines derived from more than one transformation event and/or multiple constructs. However, all lines described in a single notification must be of

the same crop or plant species. If you wish to notify APHIS about introductions of more than one crop species, send separate notifications for each species.

One notification may also include more than one introduction. More specifically, multiple *interstate movements* and/or multiple *environmental releases* (i.e. multiple field trial locations) may be described in the same notification. Notification of interstate movement and of environmental release may be combined in the same document. In such cases, notification should be submitted at least 10 days prior to the first movement and 30 days prior to the first release. Multiple *importations* also may be described in one notification. However, all importations in a single notification must be shipped *from the same origin* and *to the same destination*. Notification of importation cannot be combined with notification of interstate movement or release.

Information to Include in a Notification

> "The notification shall include the following:
> (i) Name, title, address, telephone number, and signature of the responsible person;
> (ii) Information necessary to identify the regulated article(s), including:
> (A) The scientific, common, or trade names, and phenotype of regulated article,
> (B) The designations for the genetic loci, the encoded proteins or functions, and donor organisms for all genes from which introduced genetic material was derived, and
> (C) The method by which the recipient was transformed;
> (iii) The names and locations of the origination and destination facilities for movement or the field site location for the environmental release; and the size of the introduction,
> (iv) The date and, in the case of environmental release, the expected duration of the introduction (release); and
> (v) A statement that certifies that introduction of the regulated article will be in accordance with the provisions of this section." (§ 340.3(d)(2)).

Certain information must be present in a notification to help APHIS staff determine if the proposed introduction meets eligibility criteria and performance standards. To facilitate APHIS review of this information, follow the guidelines below for organizing your information.

1. Applicant. The "applicant" is the person responsible for the information provided in the notification, who has control and will maintain control over the introduction of the regulated article to assure that Federal Regulations are met, and who certifies the notification (see **9. Certification** below). The responsible person may be a company or institution, although an individual representing the company/institution must provide their name and sign the notification.

The responsible party must be a resident of the United States, or must designate an agent who is a resident of the United States. APHIS discourages the designation of temporary employees (e.g. post-doctorates or graduate students) as responsible parties.

Applicants must provide name, title, full address, and telephone number of the primary person responsible for the introduction of the regulated article. E-mail address and fax number are

optional, but may facilitate communication. An e-mail address is required when the *ePermits* notification method is used.

2. Introduction Type. Identify whether the introduction is an importation, interstate movement, environmental release, or a combination of interstate movement and environmental release.

3. Applicant Reference Number. An applicant-supplied reference number. The purpose of this reference number is to facilitate communication regarding the status of a notification.

4. Confidential Business Information (CBI) Verification. Identify whether the submission contains CBI. If so, a CBI justification statement must be included. For more information about submission of documents containing CBI, see guidance document on **Document Submission Guidelines**. Please note that the *ePermits* system uses square brackets '[ ]' to identify CBI content. If you are submitting a notification using *ePermits*, **do not** use square brackets in your submission unless it denotes CBI content.

5. Regulated Article. Provide the common name, scientific name, and cultivar name(s) for the recipient plant. All transformed lines in a single notification must be of the same plant species. Multiple cultivars may be submitted under the same notification.

6. Phenotypic Designation. The information in this section identifies phenotype and genotype of the regulated article or articles to be introduced. Where appropriate, information should be supplied *for each group of lines having the same inserted construct.*

Phenotypic designation name. A unique identifier given to a transformed line or lines that all contain the same construct. The designation can be a name, number, short phrase, or any other unique identifier provided by the applicant to assist both the applicant and APHIS in tracking the transformed line. The designation does not have to contain information that might reveal parentage or valued characteristics. The phenotypic designation should be consistently used to identify the transformed line in all future documents submitted to APHIS, e.g. planting reports, other notifications, petitions to grant non-regulated status, etc.

Identifying lines. List all of the variety designations or identifiers for those lines to be introduced which carry a given construct.

Construct. An identifier of the genetic construct transformed into all of the lines identified above.

Mode(s) of transformation. The method used to insert the construct into the plant genome (e.g., biolistic transformation, disarmed *Agrobacterium*-mediated transformation).

Phenotype category(-ies). Please select one or more of the appropriate two-letter codes.

VR = Virus resistant
HT = Herbicide tolerant

IR = Insect resistant
FR = Fungus resistant
BR = Bacteria resistant
NR = Nematode resistant
PQ = Product quality
AP = Agronomic properties
MG = Marker genes
OO = Other

"Product quality" includes modifications such as delayed ripening of fruit, altered amino acid profile, modified seed storage proteins, enhanced floral characteristics (ornamentals), and increased solids in fruit.

"Agronomic properties" includes modifications such as drought tolerance, cold tolerance, tolerance to specific environmental stresses, enhanced nitrogen use, and male sterility.

"Other" is for modifications that do not clearly fall into one of the other categories, and has included such modifications as control lines transformed with empty vectors, alterations of gene expression for research purposes, etc.

Phenotype(s). The specific trait created by the genetic modification, and is a subset of "*phenotype category*." For example, if the category is HT, then the phenotype is resistance to a specific herbicide. If the category is VR, then the phenotype is resistance to a specific viral strain.

Genotype(s) and brief summary of construct elements. The summary of the genetic components inserted into the genome of the recipient organism, including the construct name(s) and list of construct elements. Do not abbreviate names of genetic components. For each element in a construct, in the order in which they occur in the construct, provide the following information: i) element type (e.g. promoter, gene, terminator), ii) name or function of the element (e.g. 35S promoter, extensin, catalase), iii) brief description of the element's function, iv) the organism from which the element is derived (species or virus strain). It may be convenient to present this information in a table. A single notification may include multiple constructs.

7. Introduction. This section includes details specific to each type of introduction: importation, interstate movement, and/or environmental release. Notification of interstate movements may be combined with notification of environmental release (include both sections separately), but notification of importation must be provided in a separate document.

Where the 'type of plant material' introduced is required, be as specific as possible (e.g. seeds, tubers, tissue cultures, whole plants, leaves, slips, cutting, seed potatoes, etc.).

All locations must list both county and state to facilitate information sharing with state regulatory officials and compliance with the Endangered Species Act.

Importation. Notifications of importation should have one point of origin and one destination:

POINT OF ORIGIN: Location name and complete address, including country of origin, from which the regulated article will be imported.
DESTINATION: Location name and complete address, including county and state, into which the regulated article will be imported.
DATES: The proposed dates of shipment from point of origin to destination.
QUANTITY: Type of plant material to be imported and an estimate of maximum quantity (e.g. tubers, 15 lbs.).
CONTACT PERSON(S) (optional): Name, phone number, and other contact information of a responsible person at the point of origin, destination, or both.

Interstate Movement. Notification of interstate movements may have multiple origins and destinations:

ORIGIN(S): Location name and complete address, including county and state, from which the regulated article will be moved.
DESTINATION(S): Location name and complete address, including county and state, to which the regulated article will be moved.
DATES: The proposed dates of shipment from origin to destination.
QUANTITY: Type of plant material to be moved and an estimate of maximum quantity *per movement* (e.g. tubers, 15 lbs.).
CONTACT PERSON(S) (optional): Name, phone number, and other contact information of a responsible person at any or all origins or destinations.

Environmental Release. Notification of environmental release may have multiple locations:

RELEASE LOCATION: Location name and complete address, including county and state, of the planting site. The location name must uniquely identify and distinguish the location from all other field sites to facilitate inspection. If there are multiple sites at a given address (e.g. at a farm or research plantation), the location name must be specific to the individual planting site.
GPS COORDINATES: Provide GPS coordinates for the proposed release site. Ideally this coordinate should be located close to the center of the proposed release location. If the exact location of the release site has yet to be determined, provide GPS coordinates for the boundaries that encompass the possible area that will contain the proposed release site and the area to be monitored.
RELEASE SITE HISTORY: Specify the type of agricultural activity (e.g. cropping, pasture, orchard, managed forest) and approximate length of time that the release site and area to be monitored has been under managed agricultural production.[1]
PROXIMITY TO CRITICAL HABITAT: Identify whether the proposed release site and/or area to be monitored are within designated critical habitat for a listed

[1] This information is necessary to facilitate assessment of the proposed release's possible impacts on threatened and endangered species. For additional guidance on assessment of these impacts, see *Guidance for Critical Habitat Analysis*, available online at http://www.aphis.usda.gov/brs/pdf/BRS_critical_hab_guide_notif.pdf

threatened or endangered species or within habitat proposed for designation under the Endangered Species Act (16 U.S.C., Section 1531, Endangered Species Act of 1973, as amended). If so, provide 1) the species and common names for all species that have designated critical habitat or habitat proposed for designation within the release site and monitoring area, and 2) an analysis of the effects of the proposed release on designated critical habitat or habitat proposed for designation. Indicate if the proposed release will have *no effect* or *may affect* the designated critical habitat and/or habitat proposed for designation.[1]

DURATION: The proposed dates of release/planting and final harvest/destruction of the crop. The latter date does not include any post-harvest monitoring period. Duration may be no longer than one year from the date of introduction.

SIZE OF RELEASE: Proposed total size of the release at a given site, either in area (e.g. acres, square meters, etc.) or number of propagules released (e.g. trees planted). Give both total area and area planted with transgenic crops. Area should also include any sexually compatible border rows of non-transgenic crops, if planted.

NUMBER OF PLANTINGS: If there will be multiple plantings at a given site during the proposed release period, list the number of plantings.

CONTACT PERSON(S) (optional): Name, phone number, and other contact information of a responsible person at one or more release locations.

8. Additional Information. Use this section to include any additional information that may support the applicants' certification that the regulated article will be introduced in accordance with the eligibility criteria and the performance standards set forth in 7 CFR 340.3

9. Certification. The notification must contain a signed certification that the regulated article will be introduced in accordance with the eligibility criteria and the performance standards set forth in 7 CFR 340.3. The certification must be signed and dated by the responsible party whose contact information appears in **1. Applicant** above. The certification must not stand alone on a page. A portion of at least the previous section must appear with it such that the certification can be identified as belonging to a particular notification.

An acceptable example of the certification statement is as follows:

> *I certify that the regulated article(s) described in this document will be introduced in accordance with the eligibility criteria and performance standards set forth in 7 CFR 340.3. Information contained in this document is true to the best of my knowledge. If there are any changes, I will contact APHIS promptly.*
>
> Signature _____ Date _____
> Printed Name _____

Design Protocols

Design protocols are supplemental materials that allow the applicant to describe the specific cultivation and management practices to be used in the proposed environmental release in order to meet each of the required performance standards (see **Performance Standards**). For many

crops, typical cultivation practices may not be sufficient to meet the performance standards. However, by detailing in design protocols how the applicant will alter cultivation and management practices, the applicant may be able to demonstrate that the performance standards can be met for the proposed introduction. Design protocols are not typically developed for interstate movement or importation.

APHIS may be less likely to acknowledge a notification—and thus require a permit—if, based on experience, APHIS believes that the cultivation practices typically employed for the crop would not meet the performance standards. Unlike the conditions associated with permits, design protocols are *not* enforceable conditions attached to an acknowledged notification. However, the applicant *is* responsible for meeting the performance standards described in 7 C.F.R. 340(c); failure to follow proposed design protocols may suggest that the applicant is also not meeting performance standards.

After acknowledgement, applicants *are* required to provide inspectors with on-site documentation that an introduction is meeting performance standards (see **Inspections**). Applicants are encouraged to have design protocols or similar documentation available for inspectors to help demonstrate that the introduction meets federal regulations.

Design protocols provide brief details about how the applicant intends to meet each of the six performance standards (see **Performance Standards**). Use the following as guidance for information to include in design protocols:

Performance Standard 1. Briefly describe how movements of the regulated material will be conducted to prevent dissemination during transit, and how the regulated material will be stored at the destination facility to prevent release. Include, for example, a description of packaging materials, how the materials will be identified or labeled in transit and in storage, storage location and description of the destination facilities, methods of segregation, etc. If the materials will be moved from storage to the field for release, describe how the material will be moved to prevent release in transit.

Performance Standard 2. If the article is to be released into the environment, briefly describe how the regulated material will be planted in order to prevent inadvertent mixing with other non-regulated materials. Include, for example, descriptions of how the release location is separated from adjacent plots to prevent mechanical mixing, and how planting, harvesting and other equipment will be segregated or cleaned. If seed or fruit will be produced, describe how the regulated material will be prevented from entering the food or feed supply.

Performance Standard 3. Briefly describe how the identity of the regulated materials will be maintained at all times. Include, for example, descriptions of labeling and packaging of the regulated materials, and how the release site will be identified and separated from other planting areas, using flags, stakes, markers, fallow zones, etc. Additionally, describe methods to be used to destroy or devitalize the regulated material after use (e.g. autoclaving, composting, chemical treatment), or how the regulated material will be returned to and maintained in a contained facility.

Performance Standard 4. Briefly describe how the applicant can assure that no viable vector agent is associated with the regulated material (e.g. antibiotic or other chemical treatment of tissues/cells during transformation/regeneration or of seeds, no vector agents were used).

Performance Standard 5. If the article is to be released into the environment, briefly describe the methods used to ensure that the regulated materials and any possible offspring remain confined to the designated plot and do not persist in the environment. Include, for example, descriptions of isolation distances, use of border rows or fallow zones, use of temporal isolation, cages, flower removal or bagging, male sterility, etc. In addition, describe any special circumstances that may increase the likelihood that regulated materials or offspring could persist in the environment, such as: proximity to sexually compatible wild or weedy relatives; whether the location is prone to flooding, high winds, animal incursion, or public access; if the size of the field trial is large.

Performance Standard 6. If the article is to be released into the environment, briefly describe how the field test will be terminated to reduce the likelihood of volunteers in subsequent seasons (e.g. disking, chemical treatment); and how volunteers will be managed to prevent persistence in subsequent seasons (e.g. frequency, timing, and area of monitoring, methods of removal, other crops to be planted in the field in subsequent seasons that can be readily differentiated from the regulated material).

Confidential Business Information in Notifications

General instructions for inclusion of confidential business information (CBI) in submissions to BRS are presented in the guidance document, **Document Submission Guidelines.** If a notification contains CBI, two versions of the document should be submitted to BRS: one containing CBI and another CBI-deleted version. All CBI claims must be justified in an attached justification letter. See the CBI section of the guidance document mentioned above for details on creating CBI-deleted documents and justification letters.

When sending a notification using the *ePermits* system, only the CBI version is necessary; the *ePermit* system generates the CBI-deleted version automatically. Please note that the *ePermits* system uses square brackets '[ ]' to identify CBI content. **Do not** use square brackets in your submission unless it denotes CBI content.

Only the CBI-deleted version is shared with State regulatory officials (see **APHIS Review and Acknowledgement** below). For this reason, applicants are strongly encouraged not to claim 'county' as CBI in notifications, because State regulatory officials may question the location of the introduction. In this event, the applicant may have to contact State officials directly, without APHIS' assistance, to resolve the issue. Further, any CBI claims may require FOIA office review prior to submission of the notification to the State officials.

How to Submit a Notification

If you are unable to submit notification using the *ePermits* system, notification should be mailed to:

Permit Staff
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91
4700 River Road
Riverdale, MD 20737

Because the certification statement on a notification must have an original signature, faxes and e-mail notifications are not accepted. In the *ePermits* system, an electronic version of a signature is collected. To facilitate processing of postal mail notifications, we also request the applicant submit an electronic file version (pdf, Word, or Word Perfect) of the non-CBI or CBI-deleted version.

Changes to a Notification after Submission

All notifications must be submitted in a complete and accurate manner. After APHIS has received a notification, changes to the notification are not accepted. An applicant may, however, *withdraw* a notification prior to acknowledgement.

In the event that the responsible person or contact information has changed or is found to be incorrect, promptly submit the revised information to APHIS in writing:

Compliance and Inspection Branch
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91
4700 River Road
Riverdale, MD 20737
(301) 734-0670
brscompliance@aphis.usda.gov

The letter requesting this change should include the Notification number and must bear the signature of the original responsible person, or new responsible person if changed. State regulatory officials will be notified of the change. All other changes to a notification require submission of a new notification.

If additional incorrect information is identified in an acknowledged notification, notify APHIS immediately:

Compliance and Inspection Branch
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91

4700 River Road
Riverdale, MD 20737
(301) 734-0670
brscompliance@aphis.usda.gov

If, after submitting a notification to APHIS the applicant decides *not* to introduce the regulated article, we request that the applicant send a letter to APHIS stating that the regulated article was not planted, as soon as possible (see also **Field Test Reports** below). This allows APHIS to document that there was no introduction and to cancel any scheduled inspections.

What to Expect After Notifying APHIS

APHIS Review and Acknowledgement

Shortly after APHIS receives a notification, APHIS assigns a case number to the submission and a biotechnologist reviews it to determine if it meets eligibility criteria and performance standards.

> "APHIS will provide copies of all notifications to appropriate State regulatory official(s) for review within 5 business days of receipt. Comments to APHIS from appropriate State regulatory officials in response to notifications for interstate movement of regulated articles will not be required by APHIS prior to acknowledgment, although States may provide their reviews to APHIS at their discretion." (§ 340.3(e)(1)).

APHIS sends a copy of the notification to the appropriate State regulatory officials for review and comment. Although State concurrence is not required, as a courtesy APHIS does accept feedback from State regulators and considers their input before acknowledgement of a notification.

Because APHIS does not have a formal CBI-sharing arrangement with State governments, APHIS can only send the CBI-deleted copy of the notification to State regulatory officials. If State officials request access to CBI contained in a notification, APHIS encourages them to contact the applicant directly to request disclosure of the CBI.

> "(2) The Administrator, will provide acknowledgement within 10 days of receipt that the interstate movement is appropriate under notification.
> (3) The Administrator, will provide acknowledgement within 30 days of receipt that the importation is appropriate under notification.
> (4) APHIS will provide acknowledgment within 30 days of receipt that the environmental release is appropriate under notification. Such acknowledgment will apply to field testing for 1 year from the date of introduction, and may be renewed annually by submission of an additional notification to APHIS." (§ 340.3(e)(2-4)).

After review of the notification, if APHIS agrees that the proposed introduction meets required eligibility criteria and performance standards, APHIS will issue a letter to the applicant acknowledging the appropriateness of the introduction under the notification process. APHIS will send acknowledgement letters for notification of proposed importations and environmental releases within 30 days of receipt of the notification. Acknowledgement letters for notification of interstate movement will be sent within 10 days of receipt of the notification.

The applicant must receive an acknowledgement letter that has been issued by APHIS before introducing the regulated article.

> "A person denied permission for introduction of a regulated article under notification may apply for a permit for introduction of that regulated article without prejudice." (**§** 340.3(e)(5)).

If APHIS determines that the proposed introduction is *not* appropriate for the notification process, the applicant may submit an application for an introduction *permit* without prejudice.

If an applicant has any question about whether a proposed introduction is appropriate for notification, the applicant is encouraged to contact APHIS as far in advance of the proposed introduction as possible. Although the introduction may still be eligible for a permit, approval of a permit takes more time. **Do not wait** until 30 days before your desired planting date to notify APHIS of your introduction. If your proposed introduction is determined to be inappropriate for notification and a permit is required, approval of a permit could take an additional 120 days.

Effective Dates of Acknowledged Notification

By default, an acknowledged notification is valid for one year from the date of acknowledgement. The introduction cannot proceed until on or after the date of acknowledgement, and all activities associated with the introduction (*excluding* any monitoring periods) must be completed by the expiration date. For interstate movements and importations, all shipments must have arrived at their destination before the expiration date. Environmental releases must be completely terminated by the expiration date (i.e. plants harvested, and all remaining plants and plant parts are either destroyed or moved into contained facilities).

In some cases, the applicant may wish to request that an acknowledged notification becomes effective on a specified date, such as the first proposed date of introduction. This encourages applicants to send notification to APHIS earlier, without penalizing applicants with earlier effective dates and expiration dates. Applicants should clearly state in their notification that a specific effective date is desired. In most cases this request will be granted, as long as APHIS has adequate time to acknowledge by that date. Applicants may *not* request effective dates that are sooner than the required 10- or 30-day notice periods. If an effective date is not specified, the effective date is the date of acknowledgement.

Notification of Unusual Occurrences

"The Administrator, shall be notified of any unusual occurrence within the time periods and in the manner specified in Sec. 340.4(f)(10)." (§ 340.3(d)(5)).
"APHIS shall be notified within the time periods and manner specified below, in the event of the following occurrences: (i) Orally notified immediately upon discovery and notify in writing within 24 hours in the event of any accidental or unauthorized release of the regulated article; (ii) In writing as soon as possible but not later than within 5 working days if the regulated article or associated host organism is found to have characteristics substantially different from those listed in the application for a permit or suffers any unusual occurrence (excessive mortality or morbidity, or unanticipated effect on non-target organisms)." (§ 340.4(f)(10)).

After the applicant receives APHIS acknowledgement of notification and the regulated article has been introduced, the applicant is required to notify APHIS of any unusual occurrences associated with the introduction. This is the same requirement as for introductions under permit.

In the event of any accidental or unauthorized release of the regulated article, the applicant must orally notify APHIS *immediately*, and in writing within 24 hours. Events that require immediate notification include, but are not limited to: potential dispersal of plant material outside the approved area of introduction by high winds or flooding; accidental planting of the regulated article in the wrong location; planting a variety with an unauthorized construct; damaged packaging materials; materials lost in shipping.

If the plants are observed to have any characteristics that are different from those described in the notification—particularly those characters related to plant pest risk—the applicant must notify APHIS in writing within 5 working days. Any unexpected changes in the plant's phenotype that could compromise the introduction's ability to meet eligibility criteria or performance standards should be reported. Additionally, any unexplained effects on plant heath such as crop failure or significant plant death, or unexpected impacts on non-target organisms, should be reported.

If a field trial is damaged or destroyed to the extent that the release is prematurely terminated, APHIS recommends that the written report of the unusual occurrence be combined with the required field test report (see **Field Test Report** below). Indicate clearly that the report is both a notification of the event and the final field test report.

In the event of any of these unusual occurrences, contact (orally or in writing, as required):

Compliance and Inspection Branch
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91
4700 River Road
Riverdale, MD 20737
(301) 734-0670
brscompliance@aphis.usda.gov

Failure to notify APHIS of unusual occurrences in the required time frames can result in legal action, civil penalties, and even criminal charges.

Inspections

> "Access shall be allowed for APHIS and State regulatory officials to inspect facilities and/or the field test site and any records necessary to evaluate compliance with the provisions of paragraphs (b) and (c) of this section." (**§** 340.3(d)(6)).

All introductions under the notification process are subject to inspection by trained federal and state inspectors. Access to field sites and related facilities (i.e. buildings for equipment, seed storage, processing, disposal, etc.) must be provided when requested by authorized personnel. Authorized inspectors may include personnel from APHIS' Biotechnology Regulatory Services or Plant Protection and Quarantine (PPQ), State Plant Health Directors, and other state personnel trained by APHIS.

Notifications are selected for inspection based upon a combination of risk-related factors, including: type of regulated article; size of the introduction (volume shipped or acreage); number of sites; experience and compliance history of the applicant; number of consecutive years of introduction under notification. Also, APHIS may conduct an inspection at any site and/or facility under notification regardless of the risk-related factors.

In addition to allowing access to facilities and field sites associated with the introduction, the responsible party is required to provide records that demonstrate that performance starndards are being met. Note that this normally requires documentation beyond the information submitted to APHIS in the notification. Applicants are encouraged to keep written field trial protocols to ensure that the introduction meets federal requirements, and documentation that these protocols are being followed (see also **Design Protocols** above).

For more information on inspections of introductions under notification, please contact:

Compliance and Inspection Branch
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91
4700 River Road
Riverdale, MD 20737
(301) 734-0670
brscompliance@aphis.usda.gov

28-Day Planting Report

In addition to the required field test report (below), APHIS requests that responsible parties submit a **Planting Report** within 28 days after the date of an environmental release described in an acknowledged notification. This report provides APHIS with additional detail about the *actual* releases that have taken place under an acknowledged notification. The report should include:

- Notification number
- Name of the regulated article
- Trial site (provide state, county, central GPS coordinate or address, and site identification number (if available))
- Acreage planted
- Planting date

Additionally, the report should list any sites included in the original notification that will no longer be planted. If there will be multiple planting dates, submit reports *monthly* after the first 28-day report to inform APHIS of any new plantings. Planting reports can combine information from multiple notifications; i.e. only a single report need be submitted that lists all the plantings for the previous 28 days. Reports need not be submitted when no planting occurs.

The planting report should be submitted by mail or fax to:

Compliance and Inspection Branch
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91
4700 River Road
Riverdale, MD 20737
Fax: (301) 734-8669

Field Test Report

"Field test reports must be submitted to APHIS within 6 months after termination of the field test. Field test reports shall include the APHIS reference number, methods of observation, resulting data, and analysis regarding all deleterious effects on plants, nontarget organisms, or the environment." (§ 7 C.F.R. 340.3 (d) (4))

All environmental releases of regulated articles under notification require the submission of a field test report within six months of the termination of the field test. Because APHIS does not always know the actual termination date in advance, APHIS considers the field test report to be due **no later than six months after the expiration of the notification**. APHIS uses this report for two purposes: 1) to have a record that the introduction was carried out and terminated according to federal regulations, and 2) to collect data about any observed unanticipated impacts the field trial may have had, if any. Note that this reporting requirement only applies to environmental releases under notification (not importations or interstate movements).

The following information should be included in the field test report:

- APHIS reference number
- Listing of lines planted
- The location in which the observations were made
- A brief description of the types of observations that were made:
    - What characters were observed?

    - How where they rated?
    - How frequently was the field monitored?
- A summary of the data that was gathered during the field season.
- A summary of the analysis of the collected data.
- Analysis of any deleterious effects that were observed during the field season
    - Effects on plants
    - Effects on non-target organisms
    - Effects on the environment.
- A summary of the final disposition of the regulated material.

Unusual occurrences during an introduction may require immediate notification to APHIS, particularly when related to possible accidental release or if plant characteristics are found to be different from those described in the original notification (see **Notification of Unusual Occurrences** above). The field test report, however, requires the applicant to report any additional deleterious effects observed 'on plants, nontarget organisms, or the environment,' with a description of data collection and analytical methods used to characterize those effects.

Field trials under notification lasting longer than one year from the date of introduction (i.e. for perennial crops) are permitted if the applicant submits a notification each year (see **Effective Dates of Acknowledged Notifications** above). In such cases, there is no true 'termination' of the first year's field trial. However, because subsequent years are separate notifications, the applicant should submit an 'interim' field test report within six months of the end of each notification year.

If, after a notification has been acknowledged by APHIS, the applicant decides *not* to introduce the regulated article, we request that the applicant send a letter to APHIS stating this as soon as possible. This allows APHIS to document that the introduction did not proceed and to cancel any scheduled inspections. APHIS accepts this letter in lieu of the required field test report in the case of introductions that are acknowledged but that did not take place.

If *all* lines in an ongoing field trial under notification are granted non-regulated status, the applicant must submit a field test report covering the period from introduction to the date that non-regulated status is granted. In addition to the information required by 7 CFR 340.3(d)(4), the report should state that the environmental release has been administratively terminated due to the granting of non-regulated status (include petition number). The environmental release may still be subject to inspection until the final field test report has been received. Further, if the environmental release contains any additional lines that have *not* been granted non-regulated status, the environmental release is still subject to all regulations in 7 CFR 340.3.

The field test report should be submitted by mail or fax to:

Compliance and Inspection Branch
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91
4700 River Road
Riverdale, MD 20737

Fax: (301) 734-8669

How to Find More Information

If you would like more information about introductions using the notification procedure, please contact:

Environmental Risk Analysis Programs
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 147
4700 River Road
Riverdale, MD 20737
Neil.E.Hoffman@aphis.usda.gov
(301) 734-6331

For information about a specific notification you have already submitted to APHIS-BRS, please contact:

Permit Staff
Biotechnology Regulatory Services
USDA-APHIS, Unit 91
4700 River Road
Riverdale, MD 20737
(301) 734-4878

Notification

Additional Materials

Sample Interstate Movement Notification

Sample Import Notification

Sample Environmental Release Notification

The sample documents included in this section are fictional and for educational purposes. Any similarity to real persons, companies, or technologies is coincidental.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE
BIOTECHNOLOGY REGULATORY SERVICES

BRS NOTIFICATION - INTRODUCTION OF GENETICALLY ENGINEERED PLANTS

1. NAME, ADDRESS, TELEPHONE, AND EMAIL OF APPLICANT

Name: Dr. Pam Pinders
Position:
Organization: Earthnut LLC
Organization Unique ID:
Address: Route 7
Nuttall Hiils, GA 12345
County/Province:
Township/Island:

Day Telephone: 404-555-1212
FAX:
Alternate:

Email 1: Pam@earthnut.com
Email 2:

2. INTRODUCTION TYPE

- [ ] Importation
- [x] Interstate Movement
- [ ] Interstate Movement and Release
- [ ] Release

3. APPLICANT REFERENCE NUMBER

4. CONFIDENTIAL BUSINESS INFORMATION VERIFICATION (CBI)

Does this application contain CBI? [ ] Yes [x] No

CBI Justification:

N/A

5. REGULATED ARTICLE

Scientific Name: Arachis hypogaea

Common Name: Peanut

Cultivar and/or Breeding Line: Sweet Georgia Brown

6. PHENOTYPIC DESIGNATION

1) **Phenotypic Designation Name:** BR 549
Identifying Line(s): AHT001, AHT002, AHT003
Construct(s): pNC123
Mode of Transformation: Biolistic

Phenotype(s)

MG - Visual marker

Genotype(s)

Gene(s) of Interest

Promoter: 35S **from** Cauliflower mosaic caulimovirus - Enhanced 35S

Gene: Green fluorsecent protein **from** Aequorea victoria - GFP from Aequorea victoria (Jellyfish)

Terminator: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - NOS 3' from T-DNA

7. INTRODUCTION

Point of Origin

Location Name & Description	Location Address	Contact(s)
1) Peanut Breeding Inc.	123 Groundnut Lane Chinkapin Hickory, North Carolina 54321 **County:** Chinkapin	1) Mr. Goober Peabody Peanut Breeding Inc. 123 Groundnut Lane Hickory, North Carolina 54321 **Day Telephone:** 919-555-1212 **Email 1:** Gpeabody@peanutsinc.com

Destination

Location Name & Description	Location Address	Contact(s)

1) Earthnut LLC	Route 7 Huttall Hills, Georgia 12345 **County:** Kubakim **Proposed Start Date:** 6/1/2007 **Proposed End Date:** 6/1/2008 **Quantity:** 20 Lbs Seeds	**1)** Dr. Pam Pinders Route 7 Nuttall Hills, Georgia 12345 **Day Telephone:** 404-555-1212 **Email 1:** Pam@earthnut.com

8. ADDITIONAL INFORMATION

Example of Interstate Movement Notification

I, *Pam Pinders*, certify that the regulated article will be introduced in accordance with the eligibility criteria and the performance standards set forth in 7 CFR 340.3. The above information is true to the best of our knowledge.

I acknowledge this is not an application to move or import select agents, the genes expressing select agents, or the toxins made by the select agents, as described in 9 CFR 121.

If there are any changes to the information disclosed in this application, I will contact APHIS.

9. SIGNATURE OF RESPONSIBLE PERSON	**10. DATE**

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE
BIOTECHNOLOGY REGULATORY SERVICES

BRS NOTIFICATION - INTRODUCTION OF GENETICALLY ENGINEERED PLANTS

1. NAME, ADDRESS, TELEPHONE, AND EMAIL OF APPLICANT

Name: Dr. Joe Scientist
Position:
Organization: A Major University
Organization Unique ID:
Address: 2005 Research Drive
Bluefield, MD 12345
County/Province:
Township/Island:

Day Telephone: 301-555-1212
FAX:
Alternate:

Email 1: Joe@university.edu
Email 2:

2. INTRODUCTION TYPE

- [x] Importation
- [ ] Interstate Movement
- [ ] Interstate Movement and Release
- [ ] Release

3. APPLICANT REFERENCE NUMBER

4. CONFIDENTIAL BUSINESS INFORMATION VERIFICATION (CBI)

Does this application contain CBI? [ ] Yes [x] No

CBI Justification:

N/A

5. REGULATED ARTICLE

Scientific Name: Tagetes erecta

Common Name: Marigold

Cultivar and/or Breeding Line:

6. PHENOTYPIC DESIGNATION

1) **Phenotypic Designation Name:**

Identifying Line(s): TE 001

Construct(s): BG 456

Mode of Transformation: Biolistic

Phenotype(s)

PQ - Flower color altered

Genotype(s)

Gene(s) of Interest

Promoter: 35S **from** Cauliflower mosaic caulimovirus - Enhances 35S

Enhancer: Upstream sequence from 35S promoter **from** Cauliflower mosaic caulimovirus - Additional upstream sequence from 35s promoter

Gene: Flavoniod hydrolase **from** Viola sp. (Pansy) - Flavonoid 3' - 5' hydroxylase

Terminator: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - nos 3' region from T-DNA

Selectable Marker

Promoter: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - nos promoter from T-DNA

Gene: Neomycin phosphotransferase **from** Escherichia coli - NPT II

Terminator: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - nos 3' region

7. INTRODUCTION

Point of Origin

Location Name & Description	Location Address	Contact(s)

1) BlueGenes Corporation LTD	123 Blue Mountain Road Leura, Australia **County:** NSW	

Destination

Location Name & Description	Location Address	Contact(s)
1) University Research	2005 Research Drive Bluefield, Maryland 12345 **County:** Azure **Proposed Start Date:** 6/1/2007 **Proposed End Date:** 6/1/2008 **Quantity:** 20 Vessels Tissue culture containers	

8. ADDITIONAL INFORMATION

Importation example

I, *Joe Scientist*, certify that the regulated article will be introduced in accordance with the eligibility criteria and the performance standards set forth in 7 CFR 340.3. The above information is true to the best of our knowledge.

I acknowledge this is not an application to move or import select agents, the genes expressing select agents, or the toxins made by the select agents, as described in 9 CFR 121.

If there are any changes to the information disclosed in this application, I will contact APHIS.

9. SIGNATURE OF RESPONSIBLE PERSON	**10. DATE**

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE
BIOTECHNOLOGY REGULATORY SERVICES

BRS NOTIFICATION - INTRODUCTION OF GENETICALLY ENGINEERED PLANTS

1. NAME, ADDRESS, TELEPHONE, AND EMAIL OF APPLICANT

Name: Mr. Russ Solanum
Position:
Organization: Pa's Potatoes, Inc.
Organization Unique ID:
Address: 2004 Chippewa Rd.
Baker Hill, ME 12345
County/Province: Hancock
Township/Island:

Day Telephone: 301-555-1212
FAX:
Alternate:

Email 1: Russ@taters.com
Email 2:

2. INTRODUCTION TYPE

- [ ] Importation
- [ ] Interstate Movement
- [ ] Interstate Movement and Release
- [x] Release

3. APPLICANT REFERENCE NUMBER

4. CONFIDENTIAL BUSINESS INFORMATION VERIFICATION (CBI)

Does this application contain CBI? [ ] Yes [x] No

CBI Justification:

N/A

5. REGULATED ARTICLE

Scientific Name: Solanum tuberosum

Common Name: Potato

Cultivar and/or Breeding Line: Gem Russet

6. PHENOTYPIC DESIGNATION

1) **Phenotypic Designation Name:** VR67
Identifying Line(s): ST001, ST002, ST003
Construct(s): pCP123
Mode of Transformation: Agrobacterium tumefaciens, disarmed

Phenotype(s)

VR - Potato Y potyvirus resistant

Genotype(s)

Gene(s) of Interest

Promoter: 35s **from** Cauliflower mosaic caulimovirus - Enhanced 35s 5'

Gene: Potato virus Y coat protein **from** Potato Y potyvirus, Strain 0 - Coat protein from potato virus Y - Gene is in sense orientation.

Terminator: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - Nos 3' from Agrobacterium T-DNA

Screenable Marker

Promoter: 35s **from** Cauliflower mosaic caulimovirus - Enhanced 35S 5'

Gene: Beta-glucuronidase **from** Escherichia coli - GUS gene from E. coli

Terminator: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - Nos 3' from Agrobacterium T-DNA

2) **Phenotypic Designation Name:** Potato Y potyvirus resistant
Identifying Line(s): ST004, ST005, ST006
Construct(s): pCP456
Mode of Transformation: Agrobacterium tumefaciens, disarmed

Phenotype(s)

VR - Potato Y potyvirus resistant

Genotype(s)

Gene(s) of Interest

Promoter: 35S **from** Cauliflower mosaic caulimovirus - Enhanced 35 S 5'

Gene: Potato virus Y coat protein **from** Potato Y potyvirus, Strain 0 - Potato virus Y coat protein in antisense orientation

Enhancer: Alcohol dehydrogenase intron 1 **from** Zea mays - An intron from maize adh

Terminator: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - Nos 3' from Agrobacterium T-DNA

Selectable Marker

Promoter: 35S **from** Cauliflower mosaic caulimovirus - 35S 5' from CaMV

Gene: Phosphinothricin acetyltransferase **from** Streptomyces hygroscopicus - Bar gene

Terminator: Nopaline synthase **from** Agrobacterium tumefaciens - Nos terminator

7. INTRODUCTION

Release Site

Location Name & Description	Location Address	Contact(s)
1) Russ Burbank's Farm	1776 Yukon Lane Tuber, Idaho 12345 **County:** Bingham **Proposed Field Test Start Date:** 6/1/2007 **Proposed Field Test End Date:** 6/1/2008 **Number of Proposed Plantings:** 1 **Quantity:** 50 Acres	

Provide GPS Coordinates for the proposed release site. Ideally this should be located close to the center of the proposed release location. If the exact location of the release site has yet to be determined, provide GPS coordinates for the boundaries that encompass the possible area that will contain the proposed release site and the area to be monitored.

Location GPS Coordinates: 42 53 33 N, 112 28 19 W

Approximately how long (years) has the release site and area to be monitored been under managed agricultural production? Specify the type of agricultural activity - e.g. cropping, pasture, orchard, managed forest.

Release Site History: A research farm that has been under agricultural production for more than 50 years.

Is the proposed release site and/or the area requiring monitoring (or the area within the boundaries of the possible release/monitoring area for sites where the release has yet to be determined) within designated critical habitat for a listed threatened or endangered species or within habitat proposed for designation under the Endangered Species Act (16 U.S.C., Section 1531, Endangered Species Act (ESA) of 1973, as amended)?

Answer Accordingly: ___ Yes _X_ No

If "Yes" to above question, provide the genus/species name and common name for all species that have designated critical habitat or habitat proposed for designation within the release site and monitoring area.

If "Yes" to above question, provide an analysis of the effects of the proposed release on designated critical habitat and habitat proposed for designation. Indicate if the proposed release will have "no effect on" or "may affect" the designated critical habitat and/or habitat proposed for designation.

8. ADDITIONAL INFORMATION

Example of a release Notification

I, *Russ Solanum*, certify that the regulated article will be introduced in accordance with the eligibility criteria and the performance standards set forth in 7 CFR 340.3. The above information is true to the best of our knowledge.

I acknowledge this is not an application to move or import select agents, the genes expressing select agents, or the toxins made by the select agents, as described in 9 CFR 121.

If there are any changes to the information disclosed in this application, I will contact APHIS.

9. SIGNATURE OF RESPONSIBLE PERSON	**10. DATE**

Notification

Version History

1/16/2007	Original draft.
9/7/2007	Reformatting to match ePermits (p. 16-20). Addition of guidance on TES data requirements (p. 19). Addition of guidance on design protocols (p. 21-22). Addition of sample notifications.
11/20/2007	Reformatting to remove references to chapter organization of *BRS User's Guide*
2/5/2008	Removal of word "draft" from document

United States Department
of Agriculture

Animal and
Plant Health Inspection
Service

November 5, 1996

Guide for Preparing and Submitting a Petition for Genetically Engineered Plants

Contents

How To Use This Guide iii

Sample Petition v

Sample Transmittal Letter vii

Sample Application ix

Application Cover Page xi

Table of Contents xiii

Abbreviations and Scientific Terms xv

Required Petition Elements

I. Rationale for Development of the Petitioned Crop 1

II. The Biology of the Petitioned Crop 2

III. Description of Transformation System 5

IV. Donor Genes and Regulatory Sequences 7

V. Genetic Analysis and Agronomic Performance 9

VI. Environmental Consequences of Introduction of Transformed Cultivar 15

VII. Adverse Consequences of New Cultivar Introduction 21

VIII. References 23

How to use this guide—

When an applicant has field tested a transgenic crop and accumulated enough data to show that it is free from any risk under 7 CFR 340, the applicant can petition the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture that a transgenic crop should no longer be considered a regulated article. The pages that follow represent a suggested format for submission of field test data to APHIS for deregulation of a transgenic crop.

Comments and issues that may need to be addressed by the applicant are in italics in the left margin adjacent to the portions of the sample permit to which they pertain.

APHIS took certain liberties in preparing the sample information and data presented in this publication. With the agronomic performance data and certain of the molecular biology data, material was condensed to ensure that the guide was a reasonable length and that the reader would be able to ascertain the kind of information APHIS expects to be provided in a petition.

Sample Petition

U.S. Department of Agriculture
Animal and Plant Health Inspection Service
4700 River Road, Unit 147
Riverdale, MD 20782

PETITION FOR DETERMINATION OF REGULATORY STATUS

Enclosed is a copy of a petition for determination on the regulatory status of *Gossypium hirsutum* L. cultivar “Banjaran,” which has been modified to be resistant to the herbicide glyphosate, which is currently deemed a “regulated article”. Based on the data and information contained in the enclosed petition, we believe that there is no longer “reason to believe” that the modified cotton plant should be deemed to be a regulated article. The modified cotton plant does not present a plant pest risk and is not otherwise deleterious to the environment. The enclosed petition does not contain confidential business information.

The undersigned certifies that, to the best of his/her knowledge and belief, this petition includes all data, information, and views relevant to the matter, whether favorable or unfavorable to the position of the undersigned, which is the subject of the petition.

/s/Terry Smith
1234 Main Street
American Star, Inc.
Biotechnologies, Ltd.
Detroit, Michigan 46666
313–555–1212 VOICE
313–555–2121 FAX

Sample Application

Application for Determination of Nonregulatory Status for Banjaran: The Glyphosate-Tolerant Cotton

Table of Contents

Abbreviations and Scientific Terms xv

I. Rationale for Development of Banjaran 1

II. The Cotton Family 1

- A. Cotton as a Crop 1
- B. Taxonomy of Cotton 1
- C. Genetics of Cotton 2
- D. Pollination of Cotton 3
- E. Weediness of Cotton 3
- F. Modes of Gene Escape in Cotton 3
- G. Characteristics of the Nontransformed Cultivar 4

III. Description of Transformation System 5

IV. Donor Genes and Regulatory Sequences 7

- A. 5-Enolpyruvyl-3-Phosphoshikimate Synthase Gene 7
- B. Neomycin Phosphotransferase Gene 8

V. Genetic Analysis and Agronomic Performance 9

- A. Southern Gel Analysis 9
- B. Mendelian Inheritance 10
- C. Expression of Inserted Genes 12
- D. Disease and Pest Resistance Characteristics 13
- E. Mycotoxins 13
- F. Gossypol 13
- G. Characteristics of Glyphosate-Tolerant Cotton 14

VI. Environmental Consequences of Introduction 15

- A. The Herbicide Glyphosate 15
- B. Current Uses of Herbicides on Cotton 16
- C. Banjaran: The Glyphosate-Tolerant Cotton 18
- D. Appearance of Glyphosate-Resistant Weeds 19
- E. Weediness of Banjaran 19
- F. Vertical Transfer of the New Genes 20
- G. Horizontal Transfer of the New Genes 20

VII. Adverse Consequences of Introduction 21

VIII. References 23

Abbreviations and Scientific Terms

Cyanazine (herbicide)	Bladex®
Dinoseb	an insecticide
Diuron (herbicide)	Karmex®
DMSA (herbicide)	monosodium methylarsonic acid
DSMA (herbicide)	disodium methylarsonic acid
EPSP synthase	5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase
Fluazifop (herbicide)	Fusalide®
Fluometuron (herbicide)	Cotoran®
Glyphosate (herbicide)	Roundup®
IPM	Integrated Pest Management
Linuron (herbicide)	Lorox®
NOS	nopaline synthase
NPT II	neomycin phosphotransferase
Prometryn (herbicide)	Caparol®
Sethoxydim (herbicide)	Poast®
Ti plasmid	tumor-inducing plasmid
Tn5	transposon 5
Triazine	a class of herbicides
Trifluralin (herbicide)	Treflan®

I. Rationale for Development of Banjaran

American Star Biotechnologies, Inc. has developed genetically transformed cotton plants that are tolerant to the herbicide glyphosate. The major weed pests of cotton in the Southern United States include morning glories, cocklebur, pigweeds, johnsongrass, nutsedges, prickly sida, and bermuda grass. The development of glyphosate-tolerant cotton will allow producers the option of applying glyphosate postemergence in an over-the-top application or replacing preemergence herbicides under appropriate conditions. Introduction of these plants will offer producers several advantages: several toxic herbicides, including arsenic compounds can be replaced with a herbicide that is more benign to the environment; glyphosate-tolerant cotton would be compatible with IPM schemes; and glyphosate does not have carryover problems and restrictions on application that some currently approved cotton herbicides have. No increase of the proportion of cotton acreage treated with herbicide is possible because herbicides are currently used on 99 percent of the acreage.

II. The Cotton Family

A. Cotton as a Crop

Four species of the genus Gossypium are known as cotton, which is grown primarily for the seed hairs that are made into textiles. Cotton is predominant as a textile fiber because the mature dry hairs twist in such a way that they can be spun into fine, strong threads. Other products, such as cottonseed oil, meal, and cotton linters are byproducts of fiber production.

Cotton, a perennial plant cultivated as an annual, is grown in the United States mostly in areas from Virginia southward and westward to California in an area often referred to as the Cotton Belt (McGregor, 1976).

B. Taxonomy of Cotton

The genus Gossypium, a member of the Malvaceae, consists of 39 species, 4 of which are generally cultivated (Fryxell, 1984).

The most commonly cultivated species is G. hirsutum L. Other cultivated species are G. arboreum L., G. barbadense L., and G. herbaceum L.

Four species of Gossypium occur in the United States (Fryxell, 1979; Kartesz and Kartesz, 1980). G. hirsutum is the primary cultivated cotton. G. barbadense is also cultivated. The other two species, G. thurberi Todaro and G. tomentosum Nuttall ex Seemann, are wild plants of Arizona and Hawaii, respectively. G. tomentosum is known from a few isolated locations very close to the ocean.

C. Genetics of Cotton

At least seven complete sets of genes, designated A, B, C, D, E, F, and G, are found in the genus (Endrizzi, 1984). Diploid species (2n=26) are found on all continents, and a few are of some agricultural importance. The A genome is restricted in diploids to two species (G. arboreum and G. herbaceum) of the Old World. The D genome is restricted in diploids to some species of the New World, such as G. thurberi.

By far the most important agricultural cottons are G. hirsutum and G. barbadense. These are both allotetraploids of New World origin and presumably resulted from an ancient cross between Old World A genomes and New World D genomes. How and when the original crosses occurred are speculative. Euploids of these plants have 52 somatic chromosomes and are frequently designated as AADD. Four additional New World allotetraploids occur in the genus, including G. tomentosum, the native of Hawaii. G. tomentosum has been crossed with G. hirsutum in breeding programs.

The New World allotetraploids are peculiar in the genus because the species, at least in their wild forms, grow near the ocean as invaders in the constantly disturbed habitats of strand and associated environs. It is from these "weedy" or invader species that the cultivated cottons developed (Fryxell, 1979).

D. Pollination of Cotton

Gossypium hirsutum is generally self-pollinating, but in the presence of suitable insect pollinators it can cross-pollinate. Bumble bees (Bombus spp.), Melissodes bees, and honey bees (Apis mellifera) are the primary pollinators (McGregor, 1976). Concentration of suitable pollinators varies from location to location and by season, and is considerably suppressed by herbicide use. If suitable bee pollinators are present, distribution of pollen decreases considerably with increasing distance. McGregor (1976) reported results from an experiment in which a cotton field was surrounded by a large number of honeybee colonies, and movement of pollen was traced by means of fluorescent particles. At 150 to 200 feet from the source plants, 1.6 percent of the flowers showed the presence of the particles. The isolation distance for Foundation, Registered, and Certified seeds in 7 CFR Part 201 are 1,320, 1,320, and 660 feet, respectively.

Unlike G. hirsutum, G. tomentosum seems to be pollinated by lepidopterans, presumably moths (Fryxell, 1979). The stigma in G. tomentosum is elongated, so that the plant seems incapable of self-pollination until acted upon by an insect pollinator. The flowers are unusual, too, because they stay open at night; most Gossypium flowers are ephemeral—they open in the morning and wither at the end of the same day.

E. Weediness of Cotton

Although the New World allotetraploids show some tendencies to "weediness" (Fryxell, 1979), the genus shows no aggressive, weedy tendencies in the South. Cotton is a poor competitor in most of the southern U.S. cotton-growing regions and is not allowed to overwinter. In more northerly areas where freezing conditions occur, the cotton plant cannot overwinter, and there is essentially no volunteerism from seed.

F. Modes of Gene Escape in Cotton

Genetic material of G. hirsutum may escape from a planting site by vegetative material, by seed, or by pollen.

Description of the biology of the nonmodified recipient organism should include taxonomy, genetics, pollination, evidence of reported weediness (e.g., noting whether the crop or sexually compatible species is listed in the relevant publications of the Weed Society of America), and discussion of sexual compatibility with wild and weedy free-living relatives in natural crosses or crosses with human intervention. The applicant should provide the source of recipient (cultivar name or accession number) and the weed status of its sexually compatible relatives.

Vegetative propagation is not a common mechanism by which cotton reproduces. Movement of genetic material by pollen is possible only to those plants with the proper chromosomal type, in this instance only to those allotetraploids with AADD genomes. In the United States this group would include only the cultivated species G. hirsutum, G. barbadense, and the wild species G. tomentosum. G. thurberi, the native diploid from Arizona with a DD genome, is not a suitable recipient. Movement to G. hirsutum and G. barbadense is possible if suitable insect pollinators are present and if there is a short distance from transgenic plants to recipient plants. Physical barriers, intermediate pollinator-attractive plants, and other temporal or biological impediments would reduce the potential for pollen movement.

Movement of genetic material to G. tomentosum is less well documented. The plants are chromosomally compatible with G. hirsutum, but there is some doubt as to the possibility for pollination. The flowers of G. tomentosum seem to be pollinated by moths, not bees, and the flowers are receptive at night, not in the day. Both these factors would seem to minimize the possibility of cross-pollination. However, Fryxell (1979) reports that G. tomentosum may be losing its genetic identity from introgression hybridization of cultivated cottons by unknown means.

The applicant should explicitly identify the lines to be considered in the petition and the cultivars from which they are derived. If there are multiple lines, each line must be given a unique identifier and listed in the application. For virus-resistant plants, applicants should provide in an additional section the following information on the nature of the virus that provided the sequences encoding the resistance phenotype:

i) the taxonomic name of the virus including family, genus, and strain designation including any synonyms; ii) the type of nucleic acid contained in the virus; iii) whether the infection is systemic or tissue specific; iv) whether the virus is associated with any satellite or helper viruses; v) the natural host range of the virus; vi) how the virus is transmitted; vii) if transmitted by a vector, the identity of the vector including mode of transmission (e.g., persistent or nonpersistent); viii) whether any synergistic or transcapsidation interactions with other viruses under field situations have been reported in the literature, and situations have been reported in the literature; and ix) the location and the name of the host from which the plant the virus was originally isolated.

The above information can be provided in a table format (see Table 1). This information can be supplemented by listing references that report the host range, insect vectors, etc., for the virus.

G. Characteristics of Nontransformed Cultivar

G. hirsutum L. cv. "Stoneville 825" is the cultivar that we genetically transformed. This cultivar is widely grown in the United States and was specially developed for introduction in the Mississippi Delta region. American Star Inc. has received a U.S. patent on the specific herbicide tolerant gene that has been transformed into this cultivar, and the transformed cultivar has received additional protection under the Plant Variety Protection Act of 1970. American Star Inc. intends to introduce the new traits into other cotton cultivars by traditional breeding techniques. The cultivar that has been transformed to be herbicide tolerant is called "Banjaran."

III. Description of Transformation System

For Agrobacterium-based transformation protocol, the applicant must indicate how Ti plasmid based vector was disarmed (i.e., all tumorigenic DNA was removed). Applicants can provide citations that describes the transformation procedure. However, any significant modifications of transformation, strain designation, etc. should be described.

For other methods of transformation, the applicant can describe the sources of various components of the plasmid (or other DNA including possible carrier DNA) and method of transformation by citation. However, any significant modifications in transformation, tissue regeneration, etc. should be described.

The vector system (pVST1) used to transfer the genes to cotton plants is based on the Ti plasmid from Agrobacterium tumefaciens (Fig. 1). The DNA becomes incorporated into the plant cell chromosome (Klein et at., 1989). Although some of the DNA sequences used in the transformation process were derived from the plant pathogen A. tumefaciens, the genes which cause crown gall disease were first removed, and therefore the recipient plant does not have crown gall disease (Zambryski, 1988; Klee and Rogers, 1989). Once the introduced genes are inserted into the chromosome of the recipient, they are maintained in the same manner as any other genes.

The T-DNA, which includes the glyphosate resistance and nptII genes, was transferred into the genomes of individual cotton hypocotyl sections as described by Umbeck et al. (1987). Plants were regenerated as described by Trolinder and Goodlin (1987).

The applicant must provide a detailed restriction map of the plasmid that is sufficient to be used in the analysis of Southern data. Description of added restriction sites is helpful in interpretation of Southern data and should be provided (see Fig. 1).

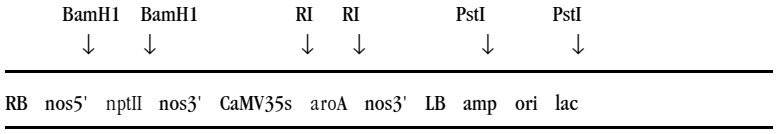


Fig 1—pVST1: A linear schematic illustration of the plasmid vector (7.8kb) that was conjugated into Agrobacterium tumefaciens (Malik and Wahab, 1993). Various components of pVST1 have been described in Table 1. Map reflects the gene order but not the sizes. The plasmid does not have restriction sites for SpI and NdeI, but has one site for SmaI and NotI.

Indicate the functions of the gene(s), promoters, leader sequences, enhancers, introns, and any other sequences that are used for gene expression in the plant and a reference describing from where the sequences were obtained. Discussion should include whether the inserted sequences are responsible for disease or injury to plants or other organisms. The nucleotide sequence(s) of the plant-expressed gene(s) should be provided by citation and not submitted in the application. If there has been a significant modification to sequences and the modified sequence has not been published, provide the complete sequence highlighting the modifications. If there have been minor modifications to the sequence of the plant-expressed gene, they should be provided. For example, if in a chemically synthesized Bt gene amino acid 23 was changed from methionine to alanine it should be stated without providing the complete sequence.

Table 1—Summary of DNA components in pVSTI

Genetic element	Source	Function
RB	A. tumefaciens	Right border of the Ti plasmid of A. tumefaciens LB 444 (White, 1992)
nos 5'	Ti plasmid of A. tumefaciens	Promoter for transcription of the nptII gene (White, 1992)
nptII	E. coli	Neomycin phosphotransferase type II enzyme that confers resistance to kanamycin and allows for selection in plant cells (Beck et al., 1982)
nos 3'	A. tumefaciens	A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene involved in transcription termination and polyadenylation (Depicker et al., 1982)
CaMV35s	Cauliflower mosaic virus	Promoter that directs transcription of cryIA(B) gene (Odell et al., 1982)
aroA	Salmonella typhimurium	5-Enolpyruvyl-3-Phosphoshikimate Synthase Gene (Pittard, 1987)
nos 3'	see above	see above
LB	A. tumefaciens	Left border of the Ti plasmid of A. tumefaciens (White, 1992)
amp	E. coli	Resistance to ampicillin expressed only in E. coli (White, 1992)
Ori	Col E1 plasmid of E. coli	The origin of replication for the PUC plasmids that allows for plasmid replication in E. coli (Vieira and Messing, 1987)
lac	E. coli	β-galactosidase of E. coli (White, 1992)

IV. Donor Genes and Regulatory Sequences

A. 5—Enolpyruvyl Shikimate Phosphate (EPSP) Synthase Gene

The donor organism used to supply the glyphosate tolerance gene, aroA, was the bacterium Salmonella typhimurium. S. typhimurium is a well-characterized enteric bacterium with homology to E. coli (Ochman and Wilson, 1987). Some strains of S. typhimurium are known to cause a disease in susceptible mice and humans, but there is no evidence that strains of the bacterium are plant pests (Le Minor, 198l). Salmonella species may be associated with vegetation as free-living organisms whenever these plants have been contaminated with fertilizers of fecal origin or when they have been irrigated with polluted water. Salmonella organisms do not seem to multiply significantly in the natural environment (outside of digestive tracts), but they can survive several weeks in water and several years in soil if the conditions of temperature, humidity, and pH are favorable (Delage, 1960).

The aroA gene, which encodes the sequence for the enzyme EPSP synthase, has no known inherent plant-pest characteristics nor direct involvement in human and animal disease. EPSP synthase is one of the enzymes in the biosynthetic pathway leading to chorismate, an intermediate in the formation of aromatic amino acids and their derivatives (Pittard, 1987). This pathway is found in most plants, many single-celled organisms, and some lower forms of animals. The aroA gene is constitutively expressed in both E. coli (Tribe et al., 1976) and S. typhimurium (Gollub et al., 1983). The gene was mutated in the bacterium to provide glyphosate resistance by the classical genetic techniques of mutation and selection (Comai et al., 1983). The description of the modified aroA gene, including the method of isolation and complete gene sequence, is contained in two published papers (Comai et al., 1983 and Stalker et al., 1985). The EPSP synthase gene was fused to the CaMV35s promoter and NOS termination/polyadenylation sequences as previously described (White, 1992). Confirmation that this gene was indeed inserted into the cotton chromosome was provided by the following: Southern gel analysis, Mendelian inheritance, measurement of expression levels of

gene product, and demonstration that the whole plant is resistant to applied glyphosate (see subsequent sections).

B. The Selectable Marker Gene: Neomycin Phosphotransferase

In addition to the aroA gene, the nptII gene from transposon Tn5 of the bacterium E. coli has been introduced in cotton to be used as a selectable marker. This gene codes for the enzyme neomycin phosphotransferase which confers resistance to the common aminoglycoside antibiotic kanamycin (Fraley et al., 1986). The DNA sequence of the gene has been determined (Beck et al., 1982). The lack of risk to humans of the nptII gene can be supported by its use in the first human gene therapy trials (Anonymous, 1990). The nptII coding region is under the control of the nos promoter and nos terminator.

None of the introduced genes has any inherent plant pest characteristics or poses a risk to plant health when introduced into the modified plants.

In general, it is always prudent to analyze data statistically when such analysis is possible. When unpublished information or an opinion has been supplied by a scientific expert, a letter communicating the information should be included in the petition. If the unpublished information provided is data resulting from scientific research then these data can be provided as a personal communication either in a letter from the researcher or in the text of the petition. In either case the materials and methods, data analysis, and discussion of the data analysis should be provided in detail. Unsupported assertions about the results of the experiment are not acceptable.

Applicants must report any differences noted between transgenic and nontransgenic plants that are not directly attributed to the expected phenotype. Differences observed could include changes in leaf morphology, pollen viability, seed germination rates, changes in overwintering capabilities, insect susceptibilities, diseases resistance, yield, agronomic performance etc. Applicants must also note the types of characteristics that were compared between transgenic and nontransgenic plants and found to be unchanged.

The applicant should describe whether data submitted are from inbred or hybrid plants; if hybrid plants, state which generation.

State whether data with respect to plant performance were generated in a greenhouse or field environment. If from the field, indicate how many sites, states and number of years the data represents.

Seed germination, seed dormancy, seed production, growth rate, and other data relating to the plant's performance will be required when the nature of the gene and the biology of the plant (including sexually-compatible relatives) warrant such data. This type of data will usually not be required for plants that have some of the following attributes: are highly domesticated (e.g., corn), are exclusively self-pollinating (e.g., soybean), are male sterile, and have high seed germination rates (>90%), and whose phenotypes are unlikely to affect performance with respect to weediness or fitness (e.g., delayed ripening or oil seed modification). Phenotypes that might require performance data (depending on the plant) include but are not limited to the following: cold tolerance, salt tolerance and tolerance or resistance to other biotic or abiotic stresses.

V. Genetic Analysis and Agronomic Performance

A. Southern Gel Analysis

The identity of the genetic material that was integrated into the genome of the transgenic plant was probed by Southern hybridization. In order to determine the number of insertion events, the DNA from the transgenic regulated plant and the parental Stoneville 825 recipient lines were digested with the restriction enzyme Nde1, which does not cleave within the pVST1 DNA. The hybridizations done with three probes indicated that the foreign DNA integrated at one site to yield the transgenic plant. This is supported by the presence of one hybridizing fragment of 20 kb that is present in the transgenic DNA but is absent from the parent.

The following restriction fragments were labeled and hybridized to the Southern blots:

1. a 300 bp EcoR 1 fragment of the aroA gene
2. a 400 bp BamH 1 fragment of the nptII gene
3. a 950 bp Pst 1 fragment with the amp and lac genes that are not expressed in plants and should not be integrated into the plant

Hybridization analysis of genomic DNA was performed following the method of Firoozabady et al. (1987). The results are shown in figure 2 for the aroA, nptII and Amp marker genes. Both aroA and nptII probes hybridize to the 20Kb fragment in lane 1. The data support the Mendelian results (shown below) that only one expressed copy of the aroA gene is present in the engineered cultivar and that a single copy of the npt II marker gene is present. No hybridization with the ampicillin or lac probe was detected.

Southern blot analysis supports the conclusion that the amp+lac sequences which lie outside the Ti plasmid left and right borders, were not integrated in to the genome of Banjaran, while the sequences inside the Ti left and right borders were.

Southern analysis should include DNA isolated from nonmodified recipient, all or selected transformed lines, and the vector. Parental plasmid DNA (eg PUC 18) not containing intended donor genes may be labeled and hybridized to Southern blots to demonstrate that only the intended sequences have been incorporated in the genome of the transgenic plant. Restriction enzymes to be used might include enzymes that do not cut within the transforming plasmid but will cut the entire insert into one fragment from the DNA of the transgenic plant.

In the case of an Agrobacterium-based transformation system, the applicant should determine if genes that reside outside the LB/RB are inserted in the genome of the regulated cultivar. If a complete copy of any of these genes is present, the applicant should determine whether it is expressed in the plant. For direct transformation systems, applicants should determine which sequences are inserted in transgenic plants and whether they are expressed. PCR analysis may be used to prove that only the targeted DNA has been incorporated. Sequencing of the transgene in plant and adjacent sequences is not required. Determination of the number of copies of integrated transgenes is not required, but the number of insertions may be used to support analysis of inheritance data.

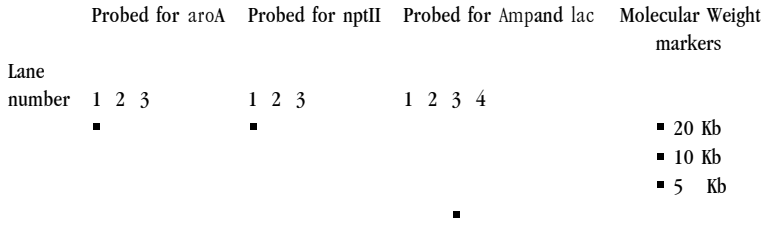


Fig. 2—Southern blot analysis of DNA: Detection of aroA and nptII genes in the Banjaran. Line lanes 1 and 2 contain 10 µg DNA of Banjaran and Stoneville 825 DNA respectively digested with NdeI. Lane 3 is Sal1 digested pUC 18 DNA as a positive control for amp and lac sequences. Lane 4 is a HindIII digest of phage lambda DNA, used as molecular weight markers. All four DNA samples were electrophoresed on three different 1% agarose gels and transferred to nitrocellulose filters. One nitrocellulose filter was hybridized with ^{32}P-labeled AroA probe, a second filter with the nptII probe and a third one with the amp+lac probe. A similar hybridization pattern was obtained when Southern blots were hybridized with either AroA or nptII probes. The PstI fragment (amp+lac) hybridized to pUC 18 DNA but not to the plant genomic DNA. This data is consistent with the presence of a single insertion of the genes between the LB and RB incorporated in the genome of the transgenic plant.

B. Mendelian Inheritance

The primary transformants that expressed the NPT II marker gene and the EPSP synthase gene were allowed to self-pollinate, and the seeds were collected. These seeds (T_1) were planted in a single 25-foot row. Seedlings were thinned to a density of two plants per foot. Seedlings were sprayed with one application of glyphosate at a rate of 8 oz/acre. Symptoms of bleaching or necrosis appeared 8 to 10 days after application and were compared to the symptoms of nontransformed plants that received an identical herbicide application. The number of resistant and sensitive plants in three separate rows was counted (Table 2). If primary transformants were expressing the EPSP gene from a single insertion site (genetic loci), the expected segregation would be 3:1. The segregation ratio totals for all 3 rows was 110:40, which fits the Mendelian prediction of 112½:37½ (χ^2 = 0.22) well. The nontransformed plants were fully susceptible to glyphosate.

If the inserted DNA sequence order is complex, as is often the case for plants engineered via direct transformation systems (e.g. electroporation, polyethylene glycol transformation of protoplasts, or particle bombardment techniques), the applicants should summarize the data by providing the following information for the all genes (whether under the direction of plant or bacterial promoters). Is there a complete copy of the gene present in regulated article? Is the protein expressed in the plant? If multiple complete copies of a gene are present, applicants do not have to determine if each copy of the gene is expressed. It is very helpful to provide a table, like the one shown below, that summarizes the results and indicates where specific data is to be found.

Gene	Is a complete copy present?	Is protein expressed in plant?	Location of detailed data
ß-lactamase	yes	no	Fig. 3, p. 7
EPSP synthase	yes	yes	Fig. 4, p. 20
nptII	yes	yes	Fig. 8, p. 21
chloramphenicol acetyltransferase	no	—	Fig. 9, p. 31

Mendelian inheritance data and Chi square analysis for at least 2 generations are appropriate to demonstrate whether the transgene is stably inserted and inherited in Mendelian fashion. Such data are generally not necessary for infertile vegetatively propagated crops such as male-sterile potatoes.

Table 2—Segregation ratios of progeny of the seeds of the primary transformants

	Ratio of Herbicide Tolerant to Susceptible Plants		
Variety	Observed	Expected	χ^2
Banjaran	36:14	37½:12½	0.24
Banjaran	39:11	37½:12½	0.24
Banjaran	35:15	37½:12½	0.67
Stoneville 825	0:50	0:50	—

RNA—Northern analysis is generally not required except for virus-resistant plants. However, such analysis may be necessary for ribozyme, truncated sense, or antisense constructs, when protein levels can not be provided.

PROTEINS—Expression levels of gene(s) of interest and marker genes in various tissues, developmental stages of plant, and experimental conditions (induced or noninduced) are required. Assays can be of enzyme activity. Serology, ELISA, and Western blots may also be used. Describing the source of the immunogen is critical for serological analysis.

For virus resistant plants, the amount of viral transgene RNA produced should be determined and compared to the amount of the RNA produced by the viral gene in an infected nontransgenic plant. Applicants should address whether the transgene RNA (or protein) is present in the same tissues as are infected during natural infections. In addition, provide the amount of both coat proteins (i.e. from the transgene and the naturally infecting virus) produced in the transgenic plant singly infected with the widely prevalent viruses in the U.S. that normally infect the recipient plant (contact APHIS for the list of these viruses). For comparison, provide the amount of both coat proteins produced in the nonengineered plant in mixed infections of the virus from which the coat protein gene was derived and the same widely prevalent viruses used in the single infection study. Provide description of symptoms of infected plants in all cases

.

C. Expression of Inserted Genes

The production of the desired proteins in Banjaran was confirmed by immunoassay. Banjaran has been modified by the insertion of the aroA gene imparting the glyphosate resistance trait. In addition to glyphosate resistance, Banjaran expresses the selectable marker protein, nptII. As measured by immunoassay, the aroA and nptII proteins were expressed at low and relatively consistent levels in Banjaran across all field sites (see data reports 94–000–02, 94–000–03). The mean from all tests reported in 10 states at 50 sites showed that Banjaran contained in leaf and seed tissue respectively approximately 12.6 µg and 17.3 µg 5-enolpyruvyl-3-shikimate phosphate synthase protein/gram fresh weight of tissue (fwt), and 6.9 and 3.3 µg nptII protein/gram fwt. At the one field site at which expression was evaluated over time, the EPSP protein levels varied less than five fold in young leaf tissue collected over the growing season with the highest levels observed early in the season (see data report 94-000-05).

The above data was based on leaf and seed. However, the levels of EPSP and nptII proteins in whole plant tissue were much lower, on a fresh weight basis, than in leaf or seed tissues. EPSP is present in whole Banjaran plants from 1.1 to 1.7 µg/g fwt of the whole plant respectively; NPTII protein levels are 14.6 µg/g/fwt for Banjaran plants. These measured concentrations were used to estimate the amount of EPSP and NPTII protein that could enter the environment due to post-harvest incorporation of 5000 mature Banjaran plants into the soil. Predicted values are 23.4 g EPSP protein/acre and 183 g NPTII protein/acre, Nectar and pollen collected from Banjaran contain very low levels of EPSP protein. The expression of EPSP protein in pollen collected from Banjaran greenhouse-grown plants were 37.8 ng/g fresh wt, respectively. The EPSP protein levels in nectar were 0.88 ng/g fresh wt collected from Banjaran plants. Thus, pollen and nectar produced by Banjaran present a low source of potential EPSP protein exposure to nontarget organisms.

For all diseases and pathogens surveyed, names of the diseases and the scientific names of the pathogens should be provided. Data from field tests in foreign countries are acceptable. If the data on diseases and pests were obtained in the foreign country, the applicant should submit information about the distribution of those pests, disease or pathogens in U.S.. Disease and pathogen susceptibility on wild type and transgenic plants should be determined preferably from natural infestations. However, if applicant must use direct inoculations; i.e., with virus resistant transgenic plants, the source and taxonomic classification of the virus should be provided.

D. Disease and Pest Resistance Characteristics

The transformed cotton plants were field-tested for 3 years at ten sites in five States (see data reports 93–1, 94–1, 95–1 in appendix). Based on field observation at these sites, pathogen-susceptibility or resistance characteristics of the transformed cultivar were unchanged when compared to those of the nontransformed cultivar. The transformed cultivar remains resistant or tolerant to bacterial blight (Xanthomonas campestris pv. malvacearum), Anthracnose boll rot, and Fusarium wilt–nematode complex rot. The transformed cultivar remains susceptible to Alternaria leaf spot, Cercospora leaf spot, and powdery mildew, as was the nontransformed cultivar.

E. Mycotoxins

Aflatoxins are most commonly found in food and feed commodities contaminated by Aspergillus flavus. Aflatoxins are the only contaminants of feeds and food routinely monitored. Banjaran was not any more susceptible to mold infection than its parent cultivar and was not going to be a source of mycotoxins.

F. Gossypol

Gossypol is a yellow pigment that occurs in various parts of the cotton plant. Cotton seed usually contains 0.4 percent to 1.7 percent gossypol (Abou-Donia, 1976). When present in untreated cottonseed meal, gossypol is toxic to animals. When cottonseed meal is processed under heat and moisture, most of the free gossypol is removed by solvent extraction or detoxified by the condensation of the aldehyde groups of gossypol with the free amino groups of proteins to form nonextractable (bound) gossypol. Flavanoids which are not major constituents in cotton were also measured because they can be toxic if eaten in large amounts. The amount of free or bound gossypol in the meal did not differ significantly between the transformed and nontransformed cultivars (Table 2).

Certain plants have minute quantities of known toxicants which may adversely impact nontarget organisms and beneficial insects; e.g., tomatine in tomatoes, cucurbitin in cucurbits, gossypol in cotton etc. If such plants are recipients of transgenes, the applicant should provide information as to whether the level of toxicants is altered. If the plant produces no known toxicant, the applicant should state so and provide the reference to support the claim. Plant toxins can be assessed by the tests and criteria that plant breeders traditionally use in the crop. In some instances, this may be done qualitatively, e.g. taste testing of cucurbits.

Table 2—Mean toxicant content in cottonseed of transformed and nontransformed cultivars grown at four sites

Quality factors[1]	Banjaran	Line 825
Free gossypol	0.75a	0.75a
Total gossypol	1.0a	1.0a
Flavonoids	1.84a	1.76a

Free and total gossypol and flavonoids are given as percent of kernel weight assayed according to the methods of Cherry (1983) and Hedin (1988) respectively. Within each column, means followed by the same letter are not significantly different according to the Newman-Kreuls multiple range test.

G. Characteristics of Glyphosate-Tolerant Cotton

We determined that the minimum level of glyphosate needed to control morning glory, cotton's major weed pest, was 8 oz/acre. At this level, the glyphosate-tolerant cotton was undamaged by the herbicide. This concentration is generally also adequate for the control of Morningglory, Common cocklebur, Pigweed, Johnsongrass, Nutsedges and Bermudagrass which are all important weeds in cotton cultivation.

Glyphosate-tolerant cotton is still susceptible to two other broad-spectrum herbicides, sulfonylurea and bromoxynil, as is its progenitor cultivar. Thus, the transformed cultivar can be eliminated using herbicides with a different mode of action from glyphosate if that is desired.

VI. Environmental Consequences of Introduction of the Transformed Cultivar

A. The Herbicide Glyphosate

N-(phosphonomethyl)glycerine (glyphosate) is an extremely effective broad-spectrum herbicide. The primary mode of action of the herbicide appears to be competitive inhibition of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate (ESPS) synthase, an enzyme in the shikimic acid pathway of aromatic amino acid biosynthesis. Glyphosate provides effective control for the majority of the world's worst weeds. It is translocated in the plant via both phloem and xylem. The broad-spectrum herbicidal activity is evident only when glyphosate is applied to foliage because there is little penetration of bark or woody stems (Franz 1983). Glyphosate becomes nontoxic upon contacting soil. Its degradation appears to be mainly microbial. Glyphosate is essentially nontoxic to mammals and birds (Anonymous 1983). Environmental impact studies indicate that the herbicide has little direct effect on animal communities (Sullivan and Sullivan 1979, 1981, 1982). However, some bird communities may show decreased population densities due to destruction of habitat caused by use of the herbicide (Morrison and Meslow 1984). Fish and invertebrates are more sensitive to the herbicide, especially to the commercial formulations, as a result of the surfactants in the formulation (Anonymous 1983). Effects of the herbicide on soil invertebrates in field situations appear to be minor (Eijsackers 1985). Although there are numerous reports of the effects of glyphosate on microbial respiration, nitrogen cycling, and cellulolytic activity in soils, no significant effects on any of these microbial processes should be observed at recommended field application rate of the herbicide (Carlisle and Trevors 1988). There have been no reports of groundwater contamination problems (Goldburg et al. 1990).

B. Current Uses of Herbicides on Cotton

Glyphosate is generally used as a foliar-applied herbicide. It is most effective for the control of perennial weeds. It is usually applied before planting to kill winter weeds or used as a spot spray at any time throughout the growing season. Glyphosate is also used for destroying weeds growing adjacent to the field.

Herbicides are applied to cotton before planting (to preplant weed foliage or in soil-incorporated applications), at planting (preemergence applications), or after seedlings emerge (postemergence directed or over-the-top). Herbicides were used on 99 percent of the cotton acreage (2.7 million acres) in the Delta region of the United States in 1990, on average from 3.6 to 4.1 treatments per acre. The severe weed pressure in the Delta is demonstrated by the large proportion of the cotton acreage receiving three or more herbicide treatments per season. At least one-quarter of the acreage in the Delta is treated with arsenic-based herbicides (DMSA or MSMA), singly or in combination with other herbicides. The total amount of arsenic-based herbicides applied to cotton in 1990 was approximately 3.5 million pounds.

Several postemergence herbicides are registered for use in cotton. They are usually applied when the plants are 3 to 6 inches high. These herbicides include diuron, fluometuron, prometryn, and cyanazine, to which MSMA or DMSA is added to broaden the spectrum. One additional application of the mixture is often made during the season since there is a limit of two applications of the arsenical herbicides. Late postemergence herbicides are sometimes applied at or near the time of the last cultivation ("layby"). Direct applications are usually placed between the rows, in order to maintain cotton seed quality. A few over-the-top herbicides are available. The two used are sethoxydim and fluazifop. Both are specific for control of grass weeds and have little effect on broadleaf plants. Before the introduction of sethoxydim and fluazifop, glyphosate was used to control grasses. Because glyphosate is nonselective, special

application methods were devised.

In the various cotton-growing regions of the country, cotton producers manage weeds differently. The following summarizes typical practices for the mid-South region (Frans and Chandler 1989).

1. Disk twice and broadcast and incorporate trifluralin before planting.
2. At planting, apply fluometuron preemergence on bands.
3. Cultivate and postdirect fluometuron plus MSMA on bands.
4. Cultivate and postdirect prometryn plus MSMA on bands.
5. Spot spray with fluazifop.
6. Cultivate and postdirect cyanazine on bands.
7. Hand hoe, cultivate, and postdirect dinoseb on bands.

Recently yields of cotton lint have declined, and continued herbicide use is strongly implicated, especially where cotton is grown continuously and the same herbicides are applied yearly (Frans and Chandler, 1989). Rogers et al. (1985, 1986) summarized results from a long-term experiment in which herbicides were applied to cotton at different levels for 6 to 7 years. No reduction in cotton yield occurred following continuous use of a minimum set of herbicide practices. When intensive practices were used (trifluralin preplant incorporated, fluometuron preemergence, two postemergence directed applications of fluometuron plus MSMA, and linuron applied at last cultivation), yields dropped on average up to 8 percent. Of the rotation crops planted on these areas, corn and sorghum suffered the least damage while soybeans and rice were severely injured.

Herbicide residues in the cotton crop have also been a concern, especially those of organic arsenicals. Both DMSA and MSMA are used postemergence for control of

grasses. Although most producers apply arsenicals in a directed manner, some apply them over the top. In the latter case, there is the possibility of high residue levels occurring in cotton, especially if applications are made during the early reproductive stage of cotton growth and if there are multiple applications (Frans and Chandler 1989).

C. Banjaran: The Glyphosate-Tolerant Cotton

Environmentally desirable feature of the introduction of glyphosate-tolerant cotton include

- It offers producers the option of replacing with glyphosate several herbicide combinations that include arsenical compounds.
- Glyphosate is less likely to lead to the development of resistant weeds than many other herbicides (Benbrook 1991).
- The introduction of glyphosate-tolerant cotton is compatible with IPM. Producers could apply the herbicide only if needed, thus reducing the use of preemergence herbicides.
- The most damaging components of glyphosate are its inert components (Goldburg et al., 1990). Recently, the Environmental Protection Agency has given glyphosate an "E" carcinogenicity (noncarcinogen) rating.
- Glyphosate does not have carryover problems.
- The introduction of glyphosate-tolerant cotton could aid in the development of minimum-till practices that would result in reduced soil erosion.

Glyphosate-tolerant cotton could enable producers to apply herbicide on an as-needed basis, a key principle of all IPM systems. If a farmer planted a field with a herbicide-tolerant variety, the farmer could cut back the initial herbicide application or try to control weeds with mechanical cultivation. If chemical weed control became necessary, herbicide could be applied over the top to the entire field or by spot application in the areas of field where weeds were threatening.

D. Appearance of Glyphosate-Resistant Weeds

A decade ago, herbicide-resistant weeds were virtually unknown. Today there are some 109 herbicide-resistant weed biotypes and more than half of them are resistant to triazine (LeBaron, 1991). Certain herbicide characteristics and application regimes favor the development of resistant weeds: a single target site and a specific mode of action, broad spectrum of activity, long residual activity the capacity to control weeds through out the year, and frequent applications without rotation to other herbicides or cultural control practices. Current application data suggest that glyphosate is unlikely to engender the development of resistance in target vegetation (Benbrook 1991).

E. Weediness of Banjaran

Will the introduction of the herbicide-tolerance genes to a plant increase its weediness? Exactly which characters define a weed is debatable, but a general consensus of the traits shared by many weeds was developed by Baker (1974). They include (1) the ability to germinate in many different environments; (2) discontinuous germination and great longevity of seed; (3) rapid growth through vegetative phase to flowering; (4) continuous seed production for as long as growing conditions permit; (5) self-compatibility but partially autogamous and apometic; (6) ability to be cross-pollinated by unspecialized visitors or wind-pollinated; (7) high seed output in favorable environments and some seed production in a wide range of environments; (8) adaption for short and long-distance dispersal; (9) vegetative production or regeneration from fragments and brittleness (hard to remove from the ground); and (10) ability to compete interspecifically by special means (e.g., rosette formation and presence of allelochemicals). Weeds need not have all these characteristics to be successful. G. hirsutum cv. Stoneville 825 that was genetically transformed is not considered a weed and has few of the 10 weedy traits. Introduction of the herbicide tolerance gene into this cultivar did not significantly change its weedy characteristics. No change was noted with transformed cultivar in the number of seeds

produced, germination and overwintering characteristics of seeds, or the number of days from planting until first boll production or flowering. The herbicide-tolerant cultivar's sensitivity to all commonly used, registered cotton herbicides was not altered except for glyphosate tolerance.

F. Vertical Transfer of the New Genes

It is apparent from the data that outcrossing from the transformed cultivar to other domestic cottons does and will occur. Of course, this kind of gene transfer happens in nature constantly. Because cotton producers purchase new seed every year, the cross-pollination phenomenon does not have a significant impact on the quality or nature of seed produced in a field where cross pollination has occurred. Seeds from all transgenic cotton cultivars will still have to meet existing certification requirements for cotton seed production.

The noncultivated Gossypium spp. found in the Southwestern United States and Hawaii are not considered weeds, and introgression of the new genes into these species would not significantly increase any of the 10 characteristics of weeds unless selection pressure favors these characteristics. With regard to glyphosate-tolerant cotton, we believe that introgression of this trait into noncultivated Gossypium spp. would not be highly favored in the absence of herbicide application. Herbicide application is likely only in agricultural settings, not in wild stands. In addition, in Hawaii, where G. tomentosum is found, cotton is not commercially produced. The great majority of cotton grown in that State is in experimental plots where cotton breeding programs operate. Cotton breeders generally bag or clip the flowers when performing crosses between plants. This practice significantly reduces the chance that flowers will be visited by pollinating insects and thus reduces the likelihood of gene movement.

G. Horizontal Transfer of the New Genes

Nonsexual, horizontal transfer of transgenes from genetically engineered plants into other organisms is not well documented and is difficult to measure (Harding, 1995). Horizontal gene transfer of transgenes from higher transgenic plants via the soil to a soil microorganism (the filamentous fungus Aspergillus niger), however, has been reported (Hoffmann et al., 1994). Genetic transfer across taxa of eukaryotes is suggested in only a few cases (Lewin, 1982; Houck et al., 1991), and of these the only one suggesting a transfer, even over evolutionary time scale (excepting Agrobacterium) from unrelated taxa to higher plants is with the case of vertebrate hemoglobin and legume hemoglobin (Wiborg et al., 1983). During the field testing of these plants, there was no evidence of horizontal transfer of the transformed genes to adjacent nonsexually compatible plants. This observation is based on sensitivity to glyphosate of weeds in the nearby fields.

VII. Adverse Consequences: New Cultivar Introduction

Assuming that the levels of known toxicants in the regulated article reported in Section V are in acceptable range; that there were no notable differences reported in Section V between transgenic and nontransgenic plant; and that the gene(s) engineered into the recipient plant have no known reported toxic properties; then, toxicological data on effects of the plant on nontarget organisms and threatened and endangered species will usually not be required

.

With respect to the herbicide-tolerant cotton, the use of glyphosate may increase if the transgenic cultivar is widely accepted by farmers. The increased use of glyphosate will be offset by the decreased use of organic arsenate-based herbicides used in conjunction with other herbicides.

The example given does not refer to a plant with a new pesticidal phenotype. For such plants, however applicants should indicate to APHIS whether they have applied for or been granted registration of the pesticide with the Environmental Protection Agency.

Applicants should also consult with APHIS on data the agency would deem to be appropriate and sufficient to demonstrate no significant impact on threatened and endangered species and beneficial nontarget organisms. This data should be submitted in the appendix of the petition application. However, brief summaries of data should appear in the petition application.

Below is an example of an acceptable summary of a test of BT cotton pollen on a beneficial nontarget organism.

A separate petition should be submitted for each category/phenotype combination. For example, a petition for Coleopteran insect-resistant potatoes or PVY-resistant potatoes should be submitted separately. However, when a single plant contains more than one phenotype modification, submit only one petition. For example, one petition should be submitted for potatoes that are both PVY and PVX resistant.

Springborn Laboratories, Inc. (Wareham, MA) conducted a 48-hour static-renewal test with Bt cotton pollen (homozygous for the cryIA(b) gene) and isogenic pollen on *Daphnia magna*, according to EPA Guideline No. 72-2. Details of these studies have been submitted in the registration package to the USEPA (see appendix). Daphnids were <24 hours old at the time of study initiation. For the definitive test, dose levels of 19, 32, 54, 90, and 150 mg pollen/L (containing 5.87 mg CryIA(b)/g pollen) were employed. These levels are a hundredfold higher than the LC_{50} for target insects. In addition, isogenic controls at the same pollen concentrations as the treatment group were tested along with a negative control group. Each test or control concentration consisted of two replicates of 10 daphnids each for a total of 20 daphnids/ concentration or control group. Daphnids were exposed for 48 hours with complete renewal of the test solutions after 24 hours.

Mean survival was 100 percent for each of the transgenic, isogenic, and negative control groups. All daphnids in the transgenic, isogenic, and negative control groups appeared normal during the study. No immobilization or sublethal signs of toxicity were observed. The only effect noted was a decrease in dissolved oxygen in the higher test concentrations of both pollen groups. Dissolved oxygen concentrations were inversely related to the concentration of pollen tested and were similar in equivalent concentrations of the transgenic and isogenic groups. The decrease in dissolved oxygen had no effect on the survival of the daphnids. Higher concentrations for both types of pollen were cloudy and some daphnids were observed to be coated with pollen. At 48 hours, the EC_{50} based on immobilization was >150 mg pollen/L for both the transgenic and isogenic groups. Based on these results, the NOEC was 150 mg transgenic or isogenic pollen/L (the highest concentration tested).

VIII. References

An, G., Costa, M. A., Mitra, A., Ha, S-B., Marton, L. 1988. Organ-specific and developmental regulation of the nopaline synthase promoter in transgenic tobacco plants. Plant Physiology 88: 547–552.

An, G., Costa, M. A., Ha, S-B. 1990. Nopaline synthase promoter is wound-inducible and auxin-inducible. Plant Cell 2: 225–234.

Anonymous. 1983. Herbicide handbook. Champaign, IL: Weed Science Society of America. 515 p.

Baker, H. G. 1974. The evolution of weeds. Annual Review of Ecology and Systematics 5: 1–24.

Benbrook, C. 1991. Racing against the clock. Agrichemical Age 35: 30–33.

Carlisle, S. M., Trevors, J. T. 1988. Glyphosate in the environment. Water, Air, and Soil Pollution 39: 409–420.

Comai, L., Sen, L. C., Stalker, D. M. 1983. An altered aroA gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. Science 221: 370–371.

Delage, B. 1960. Survie des salmonelles dans la terre. Bulletin de L'Academie Nationale Medecine 144: 686–689.

Eijsackers, H. 1985. Glyphosate in the environment. In: Grossbard, E.; Atkinson, D., eds. The herbicide glyphosate. Toronto, ON: Butterworth and Co., Ltd. pp. 151–158.

Firoozabady, E., DeBoer, D. L., Merlo, D. J., Halk, E. L., Amerson, L. N., Rashka, K. E., Murrary, E. E. 1987. Transformation of cotton Gossypium hirsutum L.) by Agrobacterium tumefaciens and regeneration of transgenic plants. Plant Molecular Biology 10: 105–116.

Fraley, R. T., Roger, S. G., Horsch, R. B. 1986. Genetic transformation in higher plants. CRC Critical Reviews in Plant Science 4: 1–46.

Frans, R. E., Chandler, J. M. 1989. Strategies and tactics for weed management. In: Frisbie, R. E., El-Zik, K. M., Wilson, L. T., eds. Integrated pest management systems and cotton production. New York, NY: John Wiley & Sons: pp. 327–359.

Franz, J. E. 1983. Uses of glyphosate. In: The herbicide glyphosate. Grossbard, E., Atkinson, D., eds. Toronto, Canada: Butterworth and Co., Ltd.: pp. 7–13.

Goldburg, R., Rissler, J., Shand, H., Hassebrook, C. 1990. Biotechnology's bitter harvest. National Wildlife Federation Press. 73 p.

Gollub, E. G., Zalkin, H., Sprinson, D. B. 1967. Correlation of genes and enzymes, and studies on regulation of the aromatic pathway in *Salmonella*. The Journal of Biological Chemistry 242: 5323–5328.

Ha, S-B., An, G. 1989. Cis-acting regulatory elements controlling temporal and organ-specific activity of nopaline synthase promoter. Nucleic Acids Research 17: 215–223.

Harding, K. 1995. Biosafety of selectable marker genes

Hoffmann, T., Golz, C., and Schieder, O. 1994. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of Aspergillus niger after co-culture with transgenic higher plants. Curr. Genet. 27:70-76.

Le Minor, L. 1981. The genus *Salmonella*. In: Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., Schlegal, H. G., eds. The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Vol. II. Berlin: Springer-Verlag: pp. 1148–1159.

Malik, V. S., Wahab S.Z. (1995) Versatile vectors for expressing genes in plants. Journal Plant Biochemistry and Biotechnology 2: 69-70

Matthysse, A. 1984. *Agrobacterium* plant surface interactions. In: Genes involved in Microbe-Plant Interactions, Plant Gene Research, Vol. 1, pp. 33-54. Verma, D. P. S., Hohn, Th. (eds.). Springer-Verlag, New York.

Morrison, M. L., Meslow, E. C. 1984. Effects of the herbicide glyphosate on bird community structure, western Oregon. Forest Science 30: 95–106.

Ochman, H., Wilson, A. C. 1987. Evolutionary history of enteric bacteria. In: F. C. Neidhardt ed. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. vol. 2. Washington, DC: American Society for Microbiology: pp. 1649-1654.

Pittard, A. J. 1987. Biosynthesis of aromatic amino acids. In: Neidhardt, F. C. ed. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology, Vol. II. Washington, DC: American Society for Microbiology: pp. 368–394.

Rogers, C. B., Talbert, R., Mattice, J. D., Lavy, T. L., Frans, R. 1986. Residual fluometuron levels in three Arkansas soils under continuous cotton (Gossypium hirsutum) production. Weed Science 34: 122–130.

Rogers, C. B., Talbert, R., Frans, R. 1985. Effect of cotton (Gossypium hirsutum) herbicide carryover on subsequent crops. Weed Science 34: 756–760.

Stalker, D. M., Hiatt, W. R., Comai, L. 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvuyl shikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. The Journal of Biological Chemistry 260: 4724–4728.

Sullivan, T. P., Sullivan, D. S. 1981. Responses of a deer mouse population to a forest herbicide application: reproduction, growth, and survival. Canadian Journal of Zoology 59: 1148–1154.

Sullivan, T. P., Sullivan, D. S. 1982. Responses of small-mammal populations to a forest herbicide application in a 20-year old conifer plantation. Journal of Applied Ecology 19: 95–106.

Sullivan, T. P., Sullivan, D. S. 1979. The effects of glyphosate herbicide on food preference and consumption in back-tailed deer. Canadian Journal of Zoology 57: 1406–1412.

Tribe, D. E., Camakaris, H., Pittard, J. 1976. Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in Escherichia coli K-12: regulation of enzyme synthesis and different growth rates. Journal of Bacteriology 127: 1085–1097.

Van Haute, E., Joos, H., Maes, M., Warren, G., Van Montagu, M., Schell, J. 1983. Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens. EMBO Journal 2:411–418.

Wiborg, O., Hyldig-nielson, J.J., Jensen, E.O.; Paulden, K.; Marcker, K.A. 1983. The structure of an unusual leghemoglobin gene from soybean. EMBO Journal 2:449–452

White, J. L. 1992. The fabricated citation. Journal XX: 000–000

Número de Protocolo: 1

Título: Evaluación Fenotípica (Equivalencia Agronómica) e Interacciones Ecológicas del Maíz MON-89034-3 X MON-00603-6

1.0 Antecedentes y Objetivo

1.1 Antecedentes

El maíz genéticamente mejorado MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 combina la característica de resistencia a insectos lepidópteros con la tolerancia a aplicaciones totales de herbicidas agrícolas de la Familia Faena en el mismo híbrido. El maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 se obtuvo mediante técnicas de cruzamiento convencional, tomando como parentales los materiales de maíz que contienen por separado cada uno de los eventos.

1. El maíz evento MON-89Ø34-3 incorpora de manera estable en su genoma la información genética que permite la expresión de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1A.105 y Cry2Ab2, activas contra insectos lepidópteros. La combinación de las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 en una sola planta proporciona un excelente control frente a plagas de insectos lepidópteros y ofrece una herramienta efectiva para el manejo de la resistencia en insectos.

2. El maíz MON-ØØ6Ø3-6 integra el gen *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. La enzima CP4 EPSPS que expresa el maíz MON-ØØ6Ø3-6 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 de herbicidas agrícolas de la Familia Faena.

1.2 Objetivo

El objetivo del presente estudio es generar los datos que permitan estimar si la modificación genética ha alterado la equivalencia agronómica del maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6 en comparación con su control convencional y las interacciones ecológicas.

2.0 Cumplimiento Regulatorio y Requerimientos de Control de Calidad

2.1 Cumplimiento Regulatorio

El material de prueba de este estudio se encuentra sujeto a regulación por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Por consiguiente, se requiere un estricto apego a las medidas de bioseguridad. La importación, movilización, almacenamiento y liberación del material para este estudio se llevarán a cabo cumpliendo los lineamientos que la Autoridad Regulatoria señale en el

Permiso de Liberación correspondiente. Los terrenos experimentales estarán aislados de otros maíces con una distancia de 200 a 500 m.

Para información adicional, ver Anexo de Cumplimiento.

2.2 Requerimientos de Control de Calidad

Las expectativas mínimas de calidad para la adquisición, registro y almacenamiento de la documentación del estudio son descritas en este protocolo.

3.0 Duración del Estudio

3.1 Fecha de inicio de la evaluación: Se indica en la solicitud

4.0 Diseño del Estudio

4.1 Materiales de Prueba, Control y Referencias

Las semillas de materiales de prueba y control serán proporcionadas por el desarrollador. Las semillas de los materiales de referencia serán adquiridas de fuentes comerciales locales. Los números de lote que identifiquen a cada una de los materiales de prueba, control y referencia que se usarán en este estudio se registrarán en una Tabla que acompañe al reporte del estudio.

4.1.1 Material de prueba

El material de prueba es el maíz MON-89034-3 X MON-00603-6.

4.1.2 Material control

El maíz convencional a utilizar como control de la evaluación fue desarrollado mediante mejoramiento convencional análogo al empleado para introgresar el transgén lo que nos permite tener un fondo genético común.

4.1.3 Material de Referencia

Los materiales de referencia serán híbridos de maíz adaptados a la región y que se encuentran disponibles comercialmente. Cuatro materiales de referencia serán evaluados en cada sitio de evaluación (Tabla 1). Los materiales de referencia se incluyen para proporcionar información sobre la variabilidad natural de los materiales híbridos.

4.2 Ubicación de la evaluación

Se establecerán en cada región al menos 8 sitios de evaluación. (Se indican en la solicitud).

4.3 Selección de los Sitios de Estudio

Los sitios de estudio estarán ubicados dentro de regiones maiceras de México (ver solicitud), que proporcionen un rango de condiciones ambientales en las cuales normalmente se cultiva el maíz. Dentro de cada sitio de estudio, los materiales de prueba, control y referencia serán cultivados bajo condiciones agronómicas similares.

4.4 Identificación de parcelas

La identificación de cada parcela se realizará mediante el uso de estacas etiquetadas con el número único de terreno, tal como se explica en la sección de "Asignación Aleatoria de Parcelas" en la bitácora del estudio.

Para mayor información, ver carpeta de Bioseguridad.

La confirmación de que el material de prueba fue sembrado de acuerdo con la asignación aleatoria proporcionada en la bitácora del estudio se realizará por medio de análisis con tiras reactivas. Los detalles del muestreo de las plantas y su análisis de reacción se establecerán en la bitácora.

4.5 Embarque, Recepción y Almacenamiento de la Semilla de maíz GM

La movilización, almacenamiento y distribución de la semilla para Prueba se apegará estrictamente a los requerimientos de bioseguridad y mediante el uso de *Formas de Transferencia de Muestras* para documentar su cadena de custodia.

La semilla debe almacenarse a temperatura ambiente en un lugar seguro hasta el momento de la siembra.

Para mayor información, ver carpeta de Bioseguridad.

4.6 Prevención de la mezcla involuntaria de Semilla para realizar la evaluación con Grano Cosechado.

Es crítico para el éxito del estudio que la identificación y la pureza de cada material de prueba, control y referencia se preserve mediante el seguimiento apropiado de procedimientos de manejo de semilla a lo largo de todo el estudio.

Para mayor información, ver carpeta de Bioseguridad.

4.7 Descripción del diseño experimental

En cada sitio, la siembra de materiales de prueba, control y referencia se realizará en un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones. La disposición del experimento se realizará segmentando el área de forma que se minimice la variación de terreno entre repeticiones. Los números de parcelas y los correspondientes números de entrada de semilla para cada sitio de estudio serán predeterminados y proporcionados en la sección de Asignación Aleatoria de la bitácora del estudio.

4.7.1 Disposición del Experimento

En cada parcela se tendrán 14 surcos de 10 m de longitud, con un espaciado entre surcos típico de la región (0.7 m a 0.8 m). Con la finalidad de establecer un campo de maíz sólido, se deberán plantar 4 surcos de maíz convencional en cada una de las calles entre las franjas de siembra o su equivalente en la misma dirección del surco si el ensayo se conduce bajo riego, (área entre cada repetición), hacia los costados y al frente y fondo del experimento (Figura 1). Adicionalmente, un bordo de maíz (aproximadamente 2.8 m – 4 m de ancho, cuatro a seis surcos), debe rodear por completo el área de siembra. La semilla para la siembra de bordos y calles debe de ser proporcionada por el investigador principal. Los surcos de las calles pueden ser perpendiculares a los surcos de las parcelas.

Una zona sin sembrar (zona de amortiguamiento) de unos 5 m o más se debe mantener alrededor de la superficie plantada, incluyendo los bordos plantados, para evitar la mezcla mecánica de las semillas. Un diagrama representativo del sitio de estudio se muestra en la Figura 1.

4.8 Métodos de Siembra

Es importante que a la totalidad del área de estudio, incluyendo los bordos y las calles, se les apliquen los mismos insumos y prácticas agronómicas y las mismas dosis, para asegurar la uniformidad de condiciones agronómicas.

4.8.1 Preparación del Área de Estudio (previo a la siembra)

El área de estudio debe de ser preparada de acuerdo a lo requerido en la localidad (por ejemplo, rastreos, riegos, fertilizantes y plaguicidas), para lograr la obtención de un cultivo agronómicamente bien manejado.

4.8.2 Fecha de Siembra y Condiciones Ambientales

La siembra se llevará a cabo dentro de la temporada típica para la región geográfica, cuidando de establecer con los predios vecinos un radio de 200 a 500 metros de aislamiento ó una separación temporal de 3 semanas entre fechas de siembra. Si los permisos de siembra se obtienen después de 3 semanas de las fechas típicas de siembra, ésta se llevará a cabo lo antes posible una vez obtenidos tales permisos. La información ambiental que se colectará el día de la siembra incluye la temperatura del aire, temperatura del suelo, humedad del suelo (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) y la humedad relativa. La siembra debe llevarse a cabo de acuerdo con toda la regulación de bioseguridad que aplique.

Para mayor información, ver carpeta de Bioseguridad.

4.8.3 Información de Siembra

En cada surco se sembrarán 9 semillas por metro. La siembra se completará de tal forma que se garantice la uniformidad de la profundidad, espaciado y densidad en la totalidad de los terrenos. Se asegurará que la persona que lleve a cabo la siembra de cada parcela, esté libre de semillas de maíz cuando se mueva entre parcelas, para evitar la mezcla accidental de semilla de prueba, control y referencia. Se espera que toda la semilla enviada al inicio sea plantada, sin embargo, cualquier remanente de semilla inicial deberá ser destruida de acuerdo a los métodos especificados en la regulación de bioseguridad.

Para mayor información, ver carpeta de Bioseguridad.

4.9 Manejo de las parcelas durante la etapa de desarrollo del cultivo

La totalidad del área de estudio, incluyendo a los surcos del bordo, deberá de ser tratada con las mismas prácticas e insumos agrícolas en idénticas dosis, para asegurar condiciones agronómicas uniformes para la producción de una cosecha aceptable.

4.9.1 Aclareo de la parcela

Cuando aproximadamente el 50% de las plantas alcance una etapa de V3-V5 y cuando se hayan registrado los datos del vigor de plántulas y emergencia, todas las parcelas deberán ser aclaradas a mano hasta alcanzar una densidad uniforme. El objetivo será obtener una densidad de 50 plantas por 10 m de surco. Durante el aclareo se deben remover plantas para alcanzar un espaciado uniforme. Hay que cortar los tallos debajo del punto de crecimiento para evitar el rebrote de la planta.

Nota: Si la densidad objetivo descrita anteriormente no se pueden alcanzar debido a una emergencia pobre, todas las parcelas deberán ser aclaradas hasta una densidad uniforme alternativa, para poder asegurar un crecimiento, desarrollo y rendimiento comparable, a menos que el Director del Estudio indique otra cosa. Es esencial que se le reporten al Director del Estudio los casos en los que no se pueda alcanzar la densidad objetivo para que se pueda determinar una nueva densidad uniforme.

4.9.2 Control de Artrópodos, Enfermedades y Maleza

Es de vital importancia para el estudio que se mantenga la salud del cultivo mediante el uso de prácticas agronómicas normales. El mantenimiento del cultivo puede requerir control de maleza, enfermedades e infestaciones de artrópodos.

Todas las aplicaciones químicas para el mantenimiento del cultivo, deben ser con productos comerciales registrados. Si la densidad poblacional de las plagas rebasa el umbral de daño económico, se aplicará el plaguicida adecuado para su control, de acuerdo a la guía técnica del INIFAP para el cultivo de maíz de la región, siguiendo las especificaciones de la etiqueta del producto.

Dado que se colectarán datos fenotípicos y de interacciones ecológicas a todo lo largo del ciclo del cultivo, es importante usar únicamente plaguicidas que no ocasionen daño significativo al cultivo. Por lo tanto, la maleza deberá ser controlada utilizando control manual o herbicidas de pre

y post emergencia, que proporcionen un control efectivo y adecuado para la seguridad del cultivo.

Nota: No se deberán emplear agroquímicos que contengan Glifosato o Bt.

4.9.3 Prácticas de cultivo

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

4.9.4 Fertilización.

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

4.9.5 Riegos

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

4.9.6 Cosecha

El grano de los surcos 2 y 3 de cada parcela debe ser cosechado de tal forma que se asegure la identidad e integridad del grano resultante.De estos dos surcos se tomarán los datos de peso de grano para contabilizar el rendimiento por Hectárea final Se debe inspeccionar la cosecha y el equipo utilizado en busca de grano sobrante, retirarlo en su totalidad y limpiar el equipo por completo, antes de cosechar la parcela siguiente. Posterior a la colecta de datos de la cosecha (ver secciones 4.11.13 – 4.11.5 del protocolo), el investigador principal no deberá destruir el grano sin la aprobación del Director del Estudio. El Director del Estudio es quien deberá proporcionar al investigador principal las instrucciones para destruir el grano de acuerdo a los métodos establecidos en la regulación de bioseguridad, o bien, para regresar el grano al promovente.

4.10 Obtención de Datos. Se hará únicamente en los surcos 2 y 3 de c/parcela

Los investigadores principales están obligados a reportar cualquier observación inesperada o problemas que se presenten en el transcurso del estudio al Director del Estudio, y a documentar la información en la bitácora del estudio.

Las características fenotípicas a evaluar y las instrucciones para su obtención se indican enseguida. Los datos fenotípicos se colectarán únicamente en los surcos 2 y 3 de cada parcela (Figura 2).

4.10.1 Monitoreo de las Etapas Fenológicas o de Crecimiento

Se debe de registrar la fecha de siembra y de la aparición de las plántulas emergidas, cuando se alcance un 50% de nacencia (ver la Publicación de las Etapas de Desarrollo de la Planta de Maíz de la Universidad de Iowa).
A partir de cuando las plántulas tengan dos hojas liguladas (etapa de crecimiento V2), se deberán de seguir registrando todas las etapas de crecimiento del maíz en las plantas de los surcos 2 y 3 para cada parcela cada 2 semanas, hasta la etapa de desarrollo R6 (madurez total). La etapa de crecimiento asignada debe ser representativa de por lo menos el 50% de las plantas de cada parcela, en cada sitio.

Etapas vegetativas	**Etapas reproductivas**
VE: Emergencia	R1 Jiloteo; los estigmas son visibles afuera de las brácteas, la polinización ocurre cuando el polen se atrapa en los estigmas emergidos
V1: 1ra hoja ligulada	R2: Ampolla; los granos son de color blanco, tienen un fluido blanco; ~ 10-14 días después de jilotear
V2: 2da hoja ligulada	R3: Lechoso, los granos tienen un fluido blanco; ~18-22 días depues de jilotear
V(n):n hoja completa, incluye vaina, lígula, limbo	R4: Masoso; los granos tienen un fluido pastoso 24-28 días después de jilotear
V18: 18ava hojacompleta; nudo de raíces visible; ~ 7 días de VT	R5: Dentado; casi todos los granos están dentados; ~ 35-42 días después de jilotear
VT: Espigado; última rama de la espiga es visible	R6: Madurez fisiológica; desarrollo de la capa negra; ~ 55-65 días después de jilotear

Iowa State University, 2005

A lo largo de la temporada, registrar cualquier característica anormal de crecimiento, incluyendo una breve descripción de los síntomas. Si se observan diferencias pronunciadas entre las parcelas, notificar al Director del Estudio.

4.10.2 Vigor de plántulas

Cuando el maíz se encuentre entre las etapas de desarrollo V2-V4, se determinará el valor del vigor de las plántulas. Una escala de 0-9 será utilizada en la que 0 = muerta, 1-3 = abajo del vigor promedio, 4-6 = vigor promedio y 7-9 sobre el vigor promedio. Estos datos se deben determinar antes del aclareo manual y/o la primera labor de cultivo.

4.10.3 Emergencia

Cuando el maíz se encuentre entre las etapas de desarrollo de V2-V4, se contarán las plántulas nacidas por surco y por parcela. Este número de plantas por parcela deberá determinarse antes del aclareo manual y/o de la primera labor de cultivo. Se hará la división del número de plántulas nacidas entre el número de semillas sembradas multiplicando por 100, para obtener el % de germinación por surco.

4.10.4 Días a 50% de liberación de polen

Determinar la fecha cuando el 50% de las plantas por parcela hayan empezado a liberar polen de la rama central de la espiga. Se consideran al menos 5 cm de florecillas abiertas por espiga por planta.

4.10.5 Días a 50% de aparición de Estigmas

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

4.10.6 Stay Green

El stay green se determinará cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo R6 (madurez fisiológica). Debe usarse una escala de calificación del 1 -9, donde 1 = 90 – 100 % de tejido verde, 5 = 50 – 59% de tejido verde, y 9 = 0 – 19% de tejido verde.

4.10.7 Altura de la mazorca

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; se medirá la altura de la mazorca en 5 plantas representativas de cada parcela, obteniendo un promedio por parcela.

4.10.8 Altura de la planta

La altura de las plantas se determinará desde la superficie del suelo hasta la lígula de la hoja bandera. Se tomará cuando el 50% de las plantas alcancen la etapa de desarrollo R2; se cuantificará la altura de 5 plantas representativas de cada parcela, obteniendo un promedio por parcela.

4.10.9 Mazorcas caídas

Dentro de los 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.

4.10.10 Acame del tallo

Dentro de los 4 días previos a la cosecha se cuantificará el número de plantas quebradas por debajo de la mazorca por parcela.

4.10.11 Acame de raíz

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.

4.10.12 Conteo Final de plantas

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.

4.10.13 Peso de la parcela

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 deberá ser incluido en el peso de la parcela.

4.10.14 Humedad del grano

Inmediatamente después de pesar el grano a la cosecha, con el determinador de humedad, se cuantificará el porcentaje de humedad del grano cosechado de cada parcela.

4.10.15 Peso de la prueba

A la cosecha se cuantificará el peso del grano cosechado de cada parcela (en kg).

4.10.16 Rendimiento

El rendimiento deberá ser calculado por el Director del Estudio utilizando datos apropiados proporcionados por el investigador principal, transformando los datos a Ton/Ha.

4.11 Interacciones Ecológicas

Las Interacciones Ecológicas a evaluar y las instrucciones para la colecta de datos se enlistan a continuación. Los datos sobre abundancia de artrópodos, daño por artrópodos, enfermedades y datos sobre estresantes abióticos, se deben de colectar en los surcos especificado~~a~~s para cada parcela en todos los sitios. (Figura 2).

Nota: La etapa de desarrollo del cultivo y la fecha de colecta deberán ser registrados en la bitácora del estudio cada vez que se realice la toma de datos de interacciones ecológicas.

4.11.1 Evaluación del daño causado por *Diabrotica spp. (D.v. virgifera y D.v. zeae), Diatraea saccharalis* (o cualquier otra *Diatraea spp.), Helicoverpa zea, y Spodoptera frugiperda.*

Diabrotica spp. El daño se evaluará cuando se observe la presencia inicial de los adultos (o alternativamente en la etapa de desarrollo típico para el análisis de la raíz) en 10 plantas del surco 5 seleccionadas al azar, pero separadas en forma equidistante utilizando la escala de calificación del estado de Iowa (0 -3) (Oleson et al. 2005):

0.00 = Sin daño por alimentación de la plaga (la calificación más baja)

1.00 = Un nudo (círculo de raíces), o el equivalente a un nudo completo, atacado hasta 3.5 a 4 cm del tallo (línea de tierra del séptimo nudo).
2.00 = Dos nudos completamente comidos.
3.00 = Tres nudos o más, completamente comidos (calificación más alta que se puede asignar).

Nota: El daño entre nudos completos comidos es considerado como el porcentaje faltante del nudo, ejm. 1.5 = 1 ½ nudos comidos; 0.25 =1/4 de un nudo comido, etc. Evaluar el daño en incrementos de 0.25.

Diatraea spp. El daño se evaluará examinando diez plantas de los surcos 12 y 13 seleccionadas al azar, pero separadas en forma equidistante. Abrir el tallo de cada planta seleccionada y contar el número de larvas vivas por planta, número de galerías de alimentación por planta, número de agujeros de entrada y salida y determinar la longitud de cada galería (cm) en el tallo. Anotar todos estos datos por planta individual por parcela..

El daño de *Helicoverpa zea* se evaluará en los surcos 12 y 13 en la etapa de desarrollo R6, examinando las mazorcas de diez plantas seleccionadas al azar pero separadas en forma equidistante. Para calificar el daño en cada mazorca usar la siguiente escala:

0 = Sin daño visible por gusano elotero
1 = Los estigmas presentan evidencia de que el gusano elotero se ha alimentado de la mazorca; el daño en la mazorca es menor a 1.0 cm
2 = El daño del gusano elotero se presenta más allá de 1.0 cm de la punta de la mazorca.
3 = La alimentación del gusano elotero se presenta más allá de los 2.0 cm de la punta de la mazorca.
4 = La alimentación del gusano elotero se presenta más allá de los 3.0 cm de la punta de la mazorca.
5 = La alimentación del gusano elotero se presenta más allá de los 4.0 cm de la punta de la mazorca.
6 = La alimentación del gusano elotero se presenta más allá de los 5.0 cm de la punta de la mazorca.
7 = La alimentación del gusano elotero se presenta más allá de los 6.0 cm de la punta de la mazorca.
8 = La alimentación del gusano elotero se presenta más allá de los 7.0 cm de la punta de la mazorca.
9 = La alimentación del gusano elotero se presenta más allá de los 8.0 cm de la punta de la espiga.

El nivel de daño de *Spodoptera frugiperda* se evaluará en diez plantas de los surcos 12 y 13 seleccionados al azar, pero separados en forma equidistante, cuando se determine que la presencia de larvas llega al máximo (típicamente no antes que la etapa de crecimiento V10 – V15); usar la siguiente escala para la calificación del daño:

0 = Sin daño visible
1 = Solo lesiones de alfiler en las hojas.
2 = Lesiones de alfiler y pequeñas lesiones círculares en hojas del cogollo.
3 = Pequeñas lesiones circulares y algunas alargadas (forma rectangular) de hasta 1.3 cm presentes en el cogollo y en las hojas enrolladas (las que están dentro del cogollo todavía).
4 = Varias lesiones pequeñas y medianas de 1.3 a 2.5 cm, lesiones elongadas presentes en hojas del cogollo y en las hojas enrolladas.
5 = Varias lesiones elongadas grandes de más de 2.5 cm presentes en unas pocas hojas del cogollo y en las hojas enrolladas (la membrana basal ha sido comida) y/o unos cuantos agujeros uniformes o irregulares de tamaño pequeño a mediano en las hojas del cogollo y/o en las hojas enrolladas.
6 = Varias lesiones grandes elongadas presentes en varias hojas del cogollo o en hojas enrolladas y varios agujeros grandes uniformes o irregulares en las hojas del cogollo y hojas enrolladas.
7 = Muchas lesiones elongadas de todos los tamaños presentes en varias hojas del cogollo y enrolladas además de varios agujeros grandes uniformes o irregulares en el cogollo y hojas enrolladas.
8 = Muchas lesiones elongadas de todos los tamaños en la mayoría de las hojas del cogollo y hojas enrolladas, además de agujeros medianos a grandes de forma uniforme o irregular en las hojas del cogollo o envueltas.
9 = Las hojas del cogollo y enrolladas prácticamente destruidas por completo.

4.11.2 Índice de Enfermedades y Factores estresantes ambientales abióticos

Las observaciones serán realizadas cuatro veces durante el desarrollo del cultivo, en las etapas señaladas abajo y se registrará la gravedad de los síntomas causados entre 3 y 5 enfermedades (ejm., *Puccinia sorghi*) y tres factores estresantes abióticos (ejm. estrés hídrico). Las observaciones se llevarán a cabo durante las siguientes etapas de crecimiento:

Observación 1: entre las etapas de desarrollo **V2 – V4.**
Observación 2: entre las etapas de desarrollo **V10 – V15.**
Observación 3: entre las etapas de desarrollo **VT – R3.**
Observación 4: en la etapa de crecimiento **R6, previo a la cosecha.**

Se debe usar la siguiente escala para evaluar las enfermedades y los Factores estresantes abióticos:

0 = nada (no se observan síntomas)
1 – 3 = leve (los síntomas no dañan el desarrollo de la planta).
4 – 6 = moderado (intermedio entre leve y severo).
7 – 9 = severo (los síntomas afectan el desarrollo de la planta).

Evaluación de la enfermedad

Los datos de la severidad de los síntomas serán recolectados de los surcos 2 y 3, en 10 plantas seleccionadas al azar pero separadas en forma equidistante dentro de los surcos, para las tres de las enfermedades más comunes de la región.

Evaluación de los Factores estresantes abióticos

Los datos del factor estresante abiótico serán recolectados de los surcos 2 y 3 de cada parcela. **Evaluar *el factor estresante sólo si todas las parcelas fueron sometidas a dicho factor. No valorar daño de herbicida (incluyendo acarreo) o el daño causado por animales.***
Los detalles de dichos daños deben ser documentados en la página de Inspección del Área de Estudio o en el Diario Cronológico de esta bitácora.

Utilizar el siguiente procedimiento para evaluar enfermedades y factores estresantes abióticos:

1) Previo a la recolección de datos, examinar el maíz que se encuentra en la proximidad del área plantada o en los surcos del bordo, en busca de enfermedades o factores estresantes abióticos.

2) Basado en estas observaciones, escoger 3 enfermedades y 3 factores estresantes abióticos que activamente estén causando daño al maíz para una evaluación subsecuente en los sembradíos. Si hubiera menos de 3 enfermedades o 3 factores estresantes abióticos, escoger factores estresantes abióticos que comúnmente ocurren y causan daño en el lugar y en ese tiempo.

Nota: Como las enfermedades y los factores estresantes abióticos son seleccionados antes de entrar en el área de lotes, es posible que no estén presentes en algunas de las parcelas. Sin embargo, las evaluaciones de las diferencias en respuesta a enfermedades y factores estresantes abióticos específicos requieren que cada parcela sea evaluada.

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

4.11.2.1 Presencia de Factores estresantes en etapa de plántula.

Cuando el 50% de las plántulas 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 0 = ningún daño (no se observan síntomas), 1-3 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas), 4-6 = daño moderado (intermedio), y 7-9 = 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 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 <u>únicamente</u> los síntomas visuales en la parte aérea de la planta.

4.11.2.2 Presencia de Factores 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 0 = ningún daño (no se observan síntomas), 1-3 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas), 4-6 = daño moderado (intermedio), y 7-9 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

Si se observa un factor de estrés como insectos plaga, enfermedad o factor abiótico después de la etapa de desarrollo vegetativo (V10-V15) pero antes de la observación en la etapa de 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.

4.11.2.3 Presencia de Factores estresantes en etapa de Floración

Cuando el 50% de las plantas estén entre las etapas de desarrollo VT-R3, se observará la severidad del daño ocasionado por insectos, enfermedades y factores abióticos. Se utilizará para ello la siguiente escala, donde 0 = ningún daño (no se observan síntomas), 1-3 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas), 4-6 = daño moderado (intermedio), y 7-9 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

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

4.11.2.4 Presencia de los Factores 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 causado por insectos, enfermedades y factores abióticos. Se utilizará para ello la siguiente escala, donde 0 = ningún daño (no se observan síntomas), 1-3 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas), 4-6 = daño moderado (intermedio), y 7-9 = severo (se observan síntomas deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas).

4.11.3 Evaluación de las pudriciones del tallo y de la mazorca/grano

Nota: La pudrición del tallo y la pudrición de la mazorca/grano será evaluada en todos los sitios en adición a las enfermedades de la etapa de cosecha. No utilizar las mismas plantas para la evaluación de la pudrición de tallo y de la mazorca/grano.

Pudrición del tallo

Al cosechar, se determinará la incidencia de la pudrición del tallo en 10 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 0 = ningún daño (no se observan síntomas), 1-3 = daño ligero (se observan síntomas pero no parecen ser deletéreos al crecimiento y desarrollo de las plantas), 4-6 = daño moderado (intermedio), y 7-9 = 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, reportando el promedio de las observaciones a las 10 plantas. Aunque esta es una evaluación destructiva, el grano de las plantas analizadas deberá ser incluido en la cuantificación del rendimiento de la parcela.

Pudrición de la mazorca y grano

Al momento de la cosecha se determinará la incidencia de pudrición de la mazorca y grano en 10 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 infestados, 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 0-9 donde 0 = ningún síntoma de pudrición (no se observan síntomas), 1-3 = pudrición ligera (síntomas observados pero no parecen ser detrimentales para la calidad del grano y el rendimiento), 4-6 = pudrición moderada (intermedio), y 7-8 = pudrición severa (con síntomas observados y que 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, reportando el promedio de las observaciones a las 10 plantas. El grano de las mazorcas analizadas deberá ser incluido en el rendimiento final de la parcela.

4.11.4 Recolección de artrópodos (trampas pegajosas)

Se colocarán dos trampas pegajosas en el surco 7 de cada parcela dejándolas por unos 7 días (figura 2). Utilizar el siguiente esquema para colocar las trampas pegajosas *(Nota: todas las etapas de crecimiento son aproximadas):*

Recolección etapa vegetativa:
Colocar las trampas pegajosas cada 2 semanas entre las etapas de desarrollo V2 al V17 con un tiempo de captura de 7 días para cada fecha.

Recolección etapa reproductiva temprana:
Colocar las trampas pegajosas en V18-VT con un tiempo de captura de 7 días para cada fecha.
Colocar trampas pegajosas en R1 con un tiempo de captura de 7 días para cada fecha.
Colocar trampas pegajosas en R2 con un tiempo de captura de 7 días para cada fecha.

Recolección etapa reproductiva tardía:
Colocar trampas pegajosas cada dos semanas entre las etapas de crecimiento R3-R5 con un tiempo de captura de 7 días para cada fecha.

Los siguientes artrópodos pueden ser recolectados utilizando las trampas pegajosas:

Georcoris spp (ninfas y adultos)
Orius spp. (ninfas y adultos)
Chrysoperla spp. (larvas y adultos)
Coccinellidae (hasta 3 especies de adultos y larvas)
Nabis spp.
Arañas
Plagas (ejemplo: *Diabrotica* spp., adultos)
Otros artrópodos.

Utilizar los siguientes métodos para colocar las trampas pegajosas:

1) Colocar una estaca de madera de 1.3 metros de largo, en el surco 7 de cada parcela experimental entre dos plantas, a 1/3 del surco (a los tres metros del surco) y otra estaca de 1.3 metros de largo entre dos plantas del mismo surco en los 2/3 del surco (a los seis metros del surco)-(Figura 2).

2) Fijar una trampa pegajosa a cada estaca (utilizando clips o broches) aproximadamente en el punto medio entre el nivel del suelo y la parte más alta del follaje de la planta.
3) Una vez que la mazorca del maíz sea visible, colocar la trampa pegajosa a la altura de la mazorca.
4) Por cada recolección de insectos específica, se colocará una trampa pegajosa por 7 días en todas las parcelas.

Registrar la etapa de desarrollo promedio para cada muestra en el cuaderno al momento de colocar la trampa. Registrar la fecha de recolección en el cuaderno. Mantener cada trampa pegajosa recolectada a 4º C, hasta su procesamiento (lectura).

Nota: Etiquetar cada trampa pegajosa con el número del estudio, código del sitio, número de parcela, y número de recolección de artrópodos previo a la colocación. Para esto se va a proporcionar un código adecuado para numeración uniforme.

4.11.5 Recolección de artrópodos (Trampas de caída: Pitfall Traps)

En cada parcela se pondrán seis trampas (ver Figura 2). Las primeras tres trampas abarcarán los surcos 9 y 10 y serán ubicadas aproximadamente a 1/3 del área de los dos surcos. Las segundas tres trampas abarcarán los mismos surcos 9 y 10 y serán ubicada aproximadamente a 2/3 del área de los dos surcos. Las trampas serán colocadas aproximadamente en la etapa de desarrollo V2 y se quedarán instaladas hasta el final del ciclo de cultivo para evitar perturbar las parcelas. *NOTA: las trampas serán utilizadas para facilitar la recolección de Carabidos y Staphylinidos que interactúan directamente con cada parcela, eliminando la necesidad de lotes grandes para estos escarabajos terrestres de alta movilidad.*

Las trampas de caída serán colocadas por aproximadamente de 2-7 días. Usar el siguiente esquema para la colocación de las trampas de caída *(Nota: Todas las etapas de crecimiento son aproximadas):*

Recolección etapa vegetativa:
Desplegar trampas de caída cada dos semanas durante las etapas de desarrollo V2-V17 con una duración de 2-7 días por despliegue.

Recolección etapa reproductiva temprana:
Desplegar trampas de caída entre las etapas de desarrollo V18-VT, con una duración de 2-7 días por despliegue.

Desplegar trampas de caída durante la etapa de desarrollo R1, con una duración de 2-7 días por despliegue.
Desplegar trampas de caída durante la etapa de desarrollo R2, con una duración de 2-7 días por despliegue.

Recolección etapa reproductiva Tardía:
Desplegar trampas de caída cada 2 semanas durante las etapas de desarrollo R3-R5 con una duración de 2-7 días por despliegue.

Los siguientes artrópodos podrán ser enumerados en las trampas de caída:
Colembola (familia o grupo funcional)
Arañas
Carabidae
Staphylinidae
Plagas (por ejemplo, *Diabrotica* spp., adultos)

Las instrucciones para montar y muestrear las trampas serán proporcionadas Registrar la etapa de crecimiento promedio y la fecha de recolección para cada muestra en el cuaderno al momento del despliegue.

Nota: Etiquetar cada contenedor de recolección de muestras con el número del estudio, código del sitio, número de lote y número de recolección de artrópodos.

4.11.6 Observaciones visuales

Se realizarán tres muestreos por observaciones visuales en 20 plantas seleccionadas al azar del surco 8, para recolectar datos por planta para los siguientes artrópodos:

Georcoris spp. (ninfas y adultos)
Orius spp. (ninfas y adultos)
Chrysoperla spp. (larvas y adultos)
Coccinellidae (hasta 3 especies de adultos y larvas)
Nabis spp.
Arañas
Plagas (por ejemplo, *Diabrotica* spp., adultos)
Otros artrópodos

Las observaciones se llevarán a cabo como se indica a continuación *(Nota: Todas las etapas de desarrollo son aproximadas):*

Observación 1=V18-VT
Observación 2=R1
Observación 3=R2

5.0 Registros a mantener

5.1 Registros del sitio de estudio

Además de la descripción requerida del sitio donde se establece el estudio, se tendrá la información general del lugar que incluirá lo siguiente:

a) Nombre del predio (si lo tiene), dirección, municipio y estado del sitio de estudio
b) Mapa del lugar, que muestre como llegar al sitio de estudio desde caminos locales
c) Latitud, Longitud y Altura sobre Nivel del Mar del sitio de estudio (es decir, coordenadas obtenidas en un dispositivo GPS)
d) Historial de uso agrícola de los últimos dos años del sitio de estudio, incluyendo plaguicidas utilizados, tipo y clasificación del suelo, y cualquier otro dato relevante para el estudio.

5.2 Requerimientos para los datos

El Director del Estudio proporcionará un cuaderno para registrar los datos y procedimientos requeridos para este estudio. Todos los cuadernos, así como otros datos crudos como las Formas de Transferencia de las Muestras, deben ser llenadas lo antes posible (para el cierre del mismo día laboral cuando las actividades u observaciones ocurren), con precisión, con tinta indeleble negra o azul, y marcadas con las iniciales/fecha por la persona responsable de hacer las anotaciones, realizando el registro (por lo menos una vez por página) en el mismo día laboral que fue registrado. Si más de un individuo registra datos en una página, debe quedar claro cual individuo fue el que realizó cada registro específicamente. Cualquier copia de datos crudos debe ser certificada con las palabras “copia exacta” y las iniciales fechadas de la persona que realizó la copia.

El cuaderno original del estudio, junto con todos los datos complementarios y de apoyo, deben ser enviados al director del estudio en un plazo no mayor a 4 semanas posteriores a la finalización de la recolección de los datos.

5.3 Datos del clima

Los datos del clima deben ser obtenidos de la estación metereológica más cercana al sitio del estudio. Los datos requeridos para este estudio son las temperaturas máximas y mínimas diarias, cantidad de lluvia diaria, y humedad relativa diaria (si se dispone de ésta) desde la siembra hasta la cosecha. Adicionalmente a los datos diarios del clima, el investigador principal proporcionará el promedio mensual de temperaturas máximas y mínimas y cantidad de lluvia reportados para los últimos 10 años, o las que estén

disponibles. El investigador principal proporcionará la descripción de cualquier evento relacionado con el clima que haya podido influenciar el comportamiento o la integridad del estudio.

5.4 Reporte final

El Director del Estudio (o la persona por él designada), preparará un reporte final que incluirá la descripción de los resultados de este estudio y una evaluación de la calidad de todos los datos y procedimientos requeridos por este protocolo. Como mínimo, el reporte final incluirá las siguientes secciones: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y Tablas y/o Figuras.

5.5 Retención de registros

Los cuadernos del estudio y los datos de apoyo serán resguardados en un lugar seguro durante todo el tiempo que dure el cultivo en campo, hasta cosecha y análisis de datos. El Director del Estudio enviará el reporte final, todos los datos crudos originales, y los datos de apoyo al Archivo Regulatorio el mismo día en que el reporte final sea firmado.

6.0 Conducción del estudio

6.1 Protocolo

El estudio será realizado de acuerdo con este protocolo y cualquier Procedimiento Estándar de Operación aplicable. El Director del Estudio proporcionará procedimientos adicionales como vaya siendo necesario.

6.2 Cambios en el protocolo

6.2.1 Modificaciones

Cualquier cambio planeado a este protocolo debe ser aprobado por el Director del Estudio ~~y~~ previo a su implementación y será documentado como una modificación al protocolo.

6.2.2 Desviaciones

Cualquier cambio no planeado al estudio o a los procedimientos aplicables será documentado como una desviación. Todas las Desviaciones potenciales deberán ser comunicadas al Director del Estudio lo más pronto posible y documentadas prontamente en el cuaderno del estudio. El Director del Estudio determinará la acción apropiada y documentará la desviación.

6.3 Reportes

Las preguntas generales sobre la conducción del estudio deben ser dirigidas al Director del Estudio o problemas que pudieran afectar la calidad o la integridad del estudio deben ser comunicadas al Director del Estudio por teléfono, e-mail o fax, dentro de un día laboral de que ocurrió.

Todos los reportes requeridos por la Autoridad Regulatoria deberán ser completados de manera oportuna.

6.4 Disposición de material de plantas y granos cosechados

A menos que sea indicado de otra manera, todos los granos cosechados y el material vegetativo que quede en las parcelas, callejones y surcos borderos deberás ser eliminados. La eliminación deberá realizarse de acuerdo con las regulaciones de bioseguridad aplicables lo mas pronto posible después de la recolección de la información de peso del grano de parcelas experimentales, la humedad del grano y los datos de peso total. Los restos de la cosecha serán incorporados al suelo después de dar un recorrido de inspección visual para retirar cualquier mazorca que pudiera haberse caído.

6.5 Monitoreo post-cosecha de las platas voluntarias

Después de la eliminación del grano cosechado, el área plantada deberá ser monitoreada en el ciclo siguiente para asegurar que todas las plantas voluntarias han sido eliminadas apropiadamente. En la temporada que sigue a la temporada experimental, los lotes regulados deben dejarse en descanso o ser plantados con una semilla diferente al maíz. Nota: es importante identificar adecuadamente el lugar de estudio (por ejemplo, estacas semi-permanentes en las 4 esquinas) para asegurar la identificación del lugar de estudio el año siguiente para el monitoreo de plantas voluntarias.

7.0 Referencias

Iowa State University. 2005. How A Corn Plant Develops, Special Report No. 48. Ames, IA.

Oleson, J.D., Y. Park, T.M. Nowatzki, and J.J. Tollefson. 2005. Node-Injury Scale to Evaluate Root Injury by Corn Rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae) Journal of Economic Entomology 98: 1-8.

Tabla 1. Entradas de semillas iniciales.

Entrada	Material	Fenotipo/ Genotipo	Monsanto Lote #
1	Prueba 1	Protección contra insectos 1	
2	Isohíbrido control 1	Control Convencional 1	
3	Prueba 2	Protección contra insectos 2	
4	Isohíbrido control 2	Control Convencional 2	
5	Prueba 3	Tolerante a Herbicida	
6	Isohíbrido control 3	Control Convencional 3	
7	Híbrido de Referencia Local Mexicano	Convencional	
8	Híbrido de Referencia Local Mexicano	Convencional	
9	Híbrido de Referencia Local Mexicano	Convencional	
10	Híbrido de Referencia Local Mexicano	Convencional	
11	Híbrido de Referencia Local Mexicano	Convencional	
12	Híbrido de Referencia Local Mexicano	Convencional	

Figura 1. Evaluación de tres eventos de prueba, tres isohíbridos controles y 6 referencias. Las parcelas (numeradas) son de 14 surcos (~10m) x 10m de largo. Los bordos se sembrarán con 4 surcos de maíz convencional. Una zona sin sembrar (zona de amortiguamiento) de ~5 m, rodeará el sitio de estudio

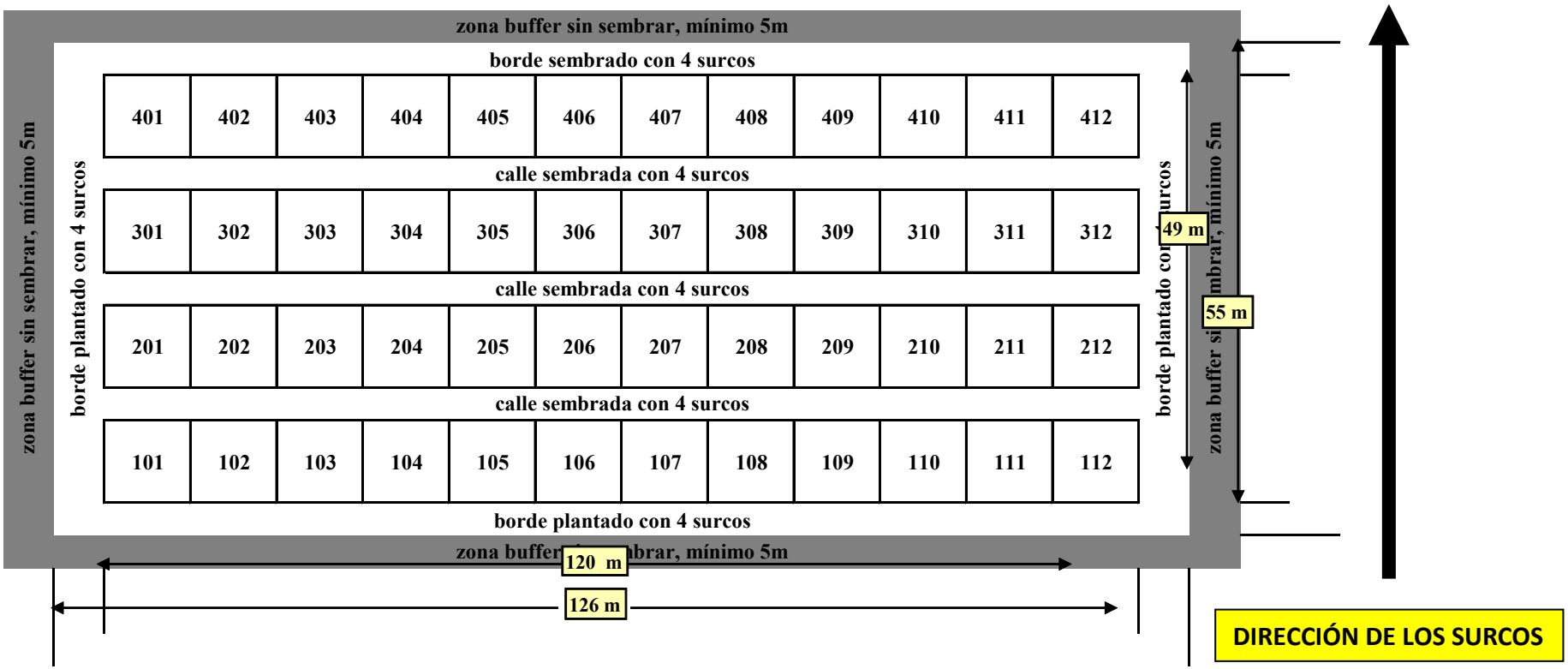
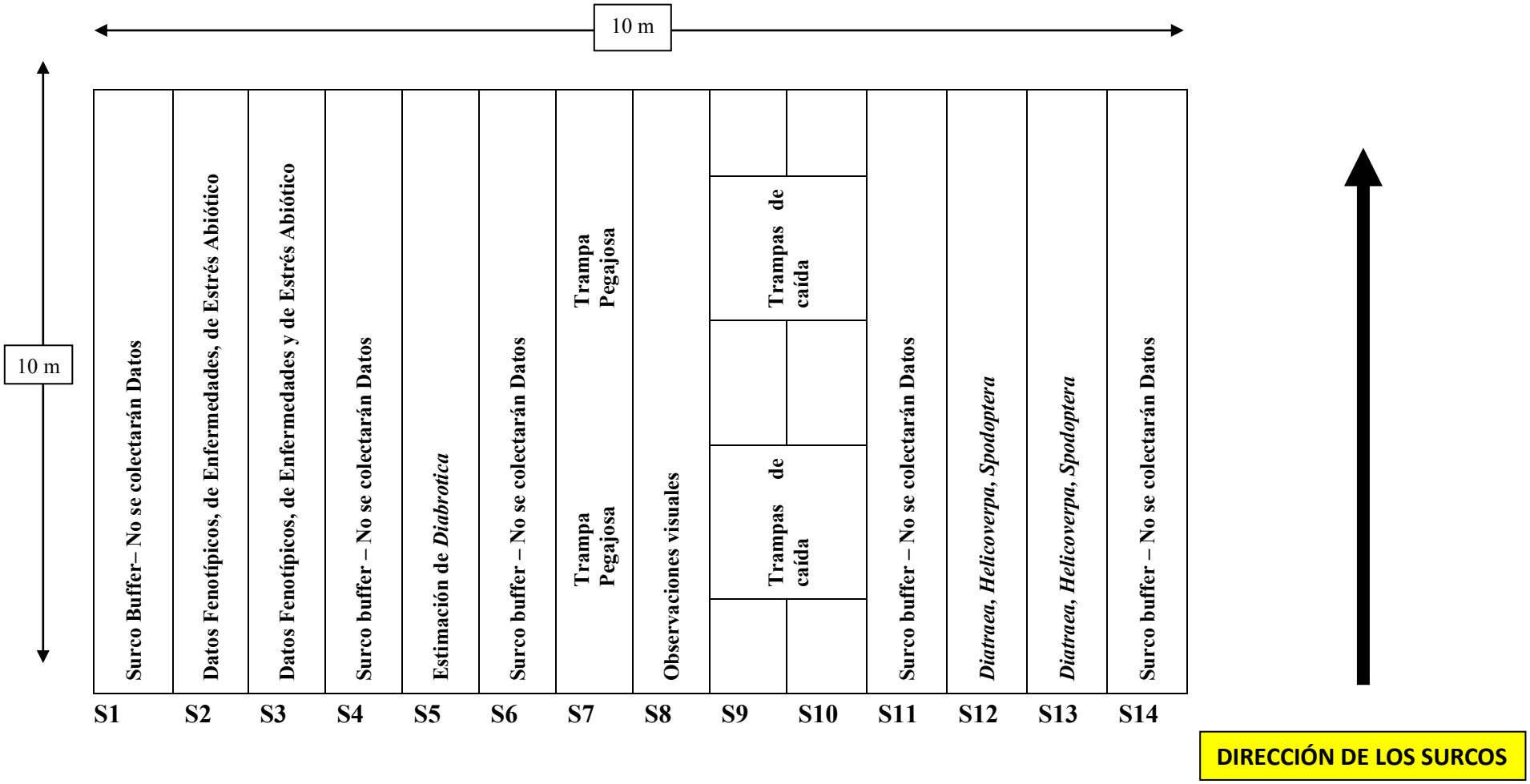


Figura 2. Diagrama de parcela representativa (no a escala)



Cantidad de semilla de maíz **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**, isohíbrido control e híbrido de preferencia local a utilizar por localidad.

	Prueba 1	Isohíbrido control 1	**Prueba 2**	Isohíbrido control 2	**Prueba 3**	Isohíbrido control 3	**Híbrido de referencia Local Mexicano**	**Híbrido de referencia Local Mexicano**	**Híbrido de referencia Local Mexicano**	**Híbrido de referencia Local Mexicano**	**Híbrido de referencia Local Mexicano**	**Híbrido de referencia Local Mexicano**
	MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6		**MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**		**MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**							
Surcos	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Metros de siembra/ parcela (1)	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m	140 m
Semillas/ parcela (2)	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas	1,260 semillas
Semillas por ensayo/ tratamiento (3)	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas	5,040 semillas
Cantidad en kg/ ensayo(4)	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg	1.68 kg
Cantidad total en kg/ ensayo(5)	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**	**2 kg**

	Kg
Total MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6	**6**
Total isohíbrido convencional (kg)	6
Total Híbrido de referencia Local	**12**

(1) 14 surcos de 10 m cada uno = 140 m
(2) 9 semillas/m
(3) 4 repeticiones
(4) 3000 semillas = 1 kg
(5) Se considerará un 20% adicional debido a problemas de semilla por disminución en la germinación.

Localidad, cantidad total de semilla requerida para la evaluación de la Evaluación Fenotípica del maíz **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**.

Sitios propuesto para el programa	**Total de semilla a importar (kg)**		
	Total MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6	Isohíbrido control	**Híbrido de referencia Local Mexicano**
Campo Experimental del INIFAP 1	6	6	**12**
Campo Experimental del INIFAP 2	6	6	**12**
Agricultor cooperante 1	6	6	**12**
Agricultor cooperante 2	6	6	**12**
Agricultor cooperante 3	6	6	**12**
Agricultor cooperante 4	6	6	**12**
Agricultor cooperante 5	6	6	**12**
Agricultor cooperante 6	6	6	**12**
Total kg:	**48 kg**	**48 kg**	**96 kg**

Protocolo número: **3**

Título del Estudio: **Efectividad biológica del maíz MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**

1.0 Antecedentes y objetivo.

1.1 Antecedentes

Si bien se ha discutido en muchos foros sobre los posibles riesgos del cultivo de maíz transgénico 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 transgénico en nuestro país.

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

El maíz genéticamente mejorado **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6** combina la característica de resistencia a insectos con la tolerancia al herbicida de la familia Faena® en el mismo híbrido. El maíz **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6** se obtuvo mediante técnicas de cruzamiento convencional, tomando como parentales los materiales de maíz que contienen por separado cada uno de los eventos.

1.2 Objetivo

a) Evaluar la respuesta de híbridos de maíz con germoplasma adaptado a las condiciones de campo en México que incorporan las características **MON-89Ø34-3** y **MON-ØØ6Ø3-6** frente a la infestación de plagas y maleza.

b) Comparar los métodos tradicionales para el control de las plagas y maleza con un programa de control basado en la tecnología **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**.

c) Evaluar el costo beneficio de la tecnología **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6** en el control de las plagas y maleza bajo las condiciones normales de producción de maíz en México.

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 SAGARPA. 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 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: Se indica en la Solicitud.

4.0 Diseño del estudio

4.1 Material de prueba.

Híbridos de maíz **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6** con germoplasma adaptado a las condiciones de México.

4.2 Controles.

Los maíces convencionales a utilizar como controles de la evaluación fueron desarrollados mediante mejoramiento convencional análogo al empleado para introgresar los transgenes, lo que nos permite tener un fondo genético común.

4.3 Justificación de los sitios seleccionados para el estudio.

Los sitios de estudio se localizarán dentro de las zonas productoras del cultivo y se llevarán a cabo bajo un conjunto de condiciones ambientales en las cuales es cultivado de manera normal. Dentro de cada localidad, los ensayos tendrán un manejo agronómico similar.

4.4 Descripción del diseño experimental.

Diseño de Bloques al azar con 4 repeticiones.

Dimensiones de parcela:

- Distancia entre surcos: **80 cm (0.8m).**
- Longitud de surcos: **5 metros**
- Número de surcos por parcela: **6**. La disposición en campo no contempla la separación entre parcelas; las calles separarán entre repeticiones.
- Superficie de parcela experimental total: **(4.8 m*5 m)= 24 m^2;**
    - Superficie de parcela útil (4 surcos centrales de 4 m de longitud a una separación de 0.8 m)= **12.8 m^2.**
- Superficie total del experimento (incluyendo calles entre repeticiones y bordos): (34.4 m x 34.4 m)= **2,227.84 m^2.**
- Superficie total **MON-ØØ6Ø3-6**: **192 m^2.**
    - Superficie de parcela útil (4 surcos centrales de 4 m de longitud a una separación de 0.8 m)= **102.4 m^2.**
- Superficie total **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6= 192 m^2.**
    - Superficie de parcela útil (4 surcos centrales de 4 m de longitud a una separación de 0.8m)= **102.4 m^2.**
- Tipo de siembra: manual; se sembrarán 45 semillas por surco, y se hará un aclareo en todas las parcelas, para dejar 30 plantas por 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 completamente al azar con 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.

Cada repetición consistirá de 5 parcelas distribuidas completamente al azar. Cada parcela consistirá de 6 surcos de 5 m de largo con un espacio entre surcos de 0.8 m; la parcela útil estará constituida por los 4 surcos centrales. Además, para evitar efectos por competencia no se incluirá espacio entre parcelas. El ensayo estará 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.

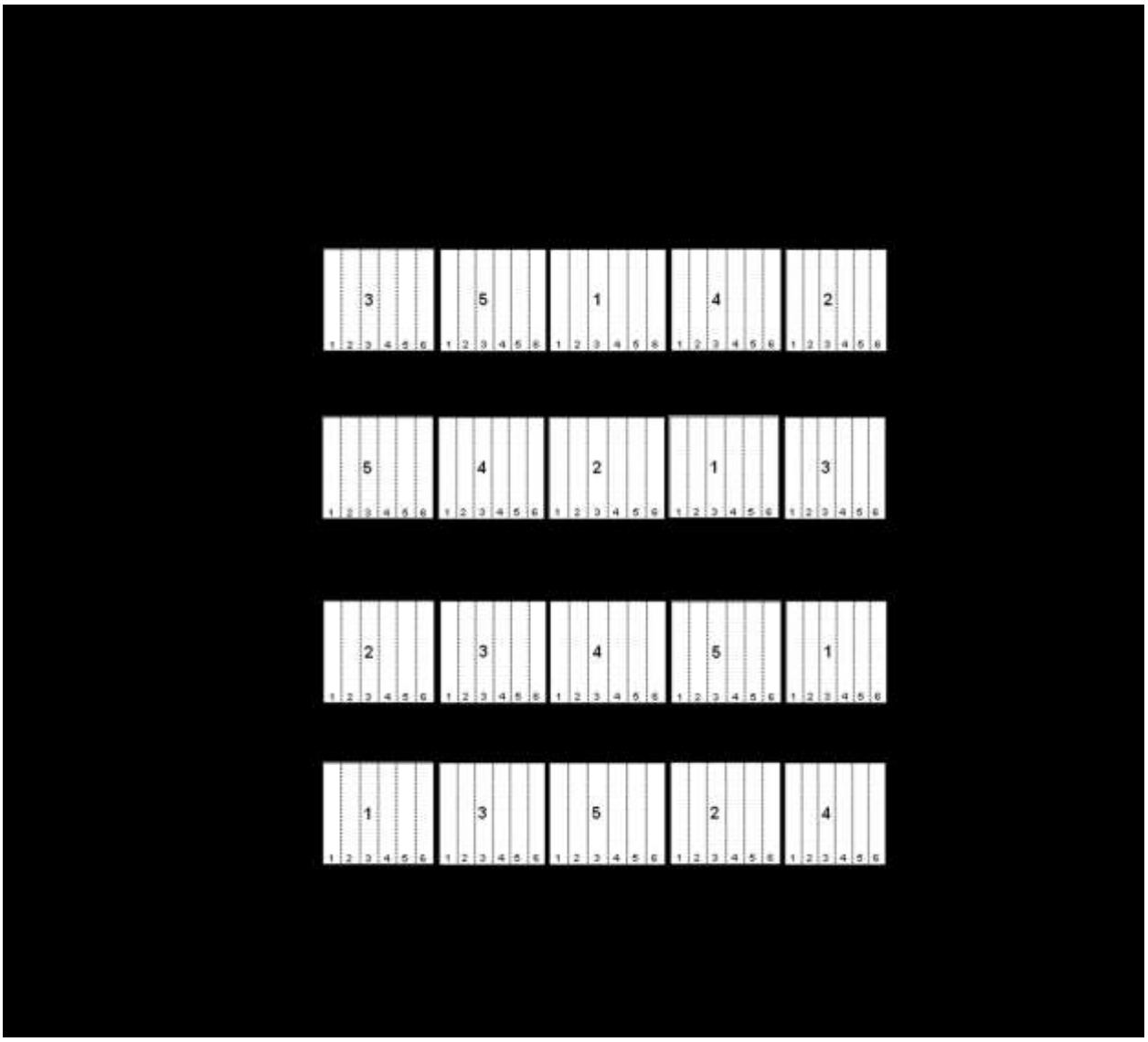
Cuadro 1. Cantidad de semilla de maíz GM y convencional a utilizar por localidad.

	1. Isohíbrido convencional, control de maleza convencional, control de insectos convencional	**2. MON-ØØ6Ø3-6, control de maleza convencional, control de insectos convencional**	**3. MON-ØØ6Ø3-6, control de maleza 2 L herbicida de la familia Faena ® en etapa V2-V4 + 2 L herbicida de la familia Faena ® en etapa V6-V8, control de insectos**	**4. MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6, control de maleza 2 L herbicida de la familia Faena ® en etapa V2-V4 + 2 L herbicida de la familia Faena ® en etapa V6-V8, control de insectos**	**5. MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6, control de maleza convencional, control de insectos**
		Surcos MON-ØØ6Ø3-6 2	**Surcos MON-ØØ6Ø3-6**	**Surcos MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**	**Surcos MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**
Surcos	6	6	6	6	6
Metros de siembra/ parcela (1)	30 m	30 m	30 m	30 m	30 m
Semillas/ parcela (2)	270 semillas	270 semillas	270 semillas	270 semillas	270 semillas
Semillas por ensayo/ tratamiento (3)	1,080 semillas	1,080 semillas	1,080 semillas	1,080 semillas	1,080 semillas
Cantidad en kg/ ensayo(4)	0.360 kg	0.360 kg	0.360 kg	0.360 kg	0.360 kg
Cantidad total en kg/ ensayo(5)	**0.432**	**0.432**	**0.432**	**0.432**	**0.432**
Cantidad total en kg/ con las 4 repeticiones (6)	**1.778**	**1.778**	**1.778**	**1.778**	**1.778**

	Kg
Total isohíbrido convencional (kg)	1.78
Total MON-ØØ6Ø3-6 (kg)	**3.56**
Total MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6	**3.56**

(1) 6 surcos de 5 metros cada uno = 30 m
(2) 9 semillas por metro
(3) 4 repeticiones
(4) 3000 semillas = 1 kg
(5) Se considerará un 20% adicional debido a problemas de semilla por disminución en la germinación.
(6) Adicionalmente, se están incluyendo 50 g adicionales de cada material considerando la toma de muestra que realiza la SAGARPA en la Aduana de entrada al país para análisis fitosanitario.

Se anexa un croquis representativo del ensayo.



Diseño experimental: Bloques al azar, 4 repeticiones.

Tratamientos:

1. Isohíbrido convencional, control de maleza convencional, control de insectos convencional
2. Maíz MON-00603-6, control de maleza convencional, control de insectos convencional.
3. Maíz MON-00603-6, control de maleza 2 L/ha de Faena Fuerte con Transorb® en etapa V2-V4 + 1.25 l/ha en etapa V6-V8, manejo integrado de insectos
4. Maíz MON 89034 x MON-00603-6, control de maleza 2 L/ha de Faena Fuerte con Transorb® en etapa V2-V4 + 2 L/ha de Faena Fuerte con Transorb® en etapa V6-V8, manejo integrado de insectos.
5. Maíz MON 89034 x MON-00603-6, control de maleza convencional, manejo integrado de insectos.

Cuadro 2. Localidad, fecha de siembra y cantidad total de semilla requerida para la evaluación de la efectividad biológica del maíz **MON-89Ø34-3 X MON-ØØ6Ø3-6**.

Sitios propuesto para el programa	**SUPERFICIES**				**Total de semilla a importar (kg)**		
	Total del experimento (m^2) (1)	Isohíbrido convencional (m^2) (2)	MON-ØØ6Ø3-6 (m^2) (3)	MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6(m^2) (4)	Isohíbrido Convencional (kg)	MON-ØØ6Ø3-6 (kg)	MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6 (kg)
Campo Experimental del INIFAP 1	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Campo Experimental del INIFAP 2	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Agricultor cooperante 1	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Agricultor cooperante 2	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Agricultor cooperante 3	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Agricultor cooperante 4	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Agricultor cooperante 5	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Agricultor cooperante 6	2,227.84	96	192	192	1.78	**3.56**	**3.56**
Total:	**17,822.72 m^2**	**768 m^2**	**1,536 m^2**	**1,536 m^2**	**14.24 kg**	**28.48 kg**	**28.48 kg**

(1) Superficie total del experimento, incluye parcelas experimentales con todos los materiales a evaluar, calles entre repeticiones y bordos.

(2) Superficie Isohíbrido convencional, 6 surcos de 5 m de largo con una separación entre surcos de 0.8 m = (5m*4.8m), 4 parcelas (Un tratamiento con Isohíbrido convencional y 4 repeticiones).

(3) Superficie MON-ØØ6Ø3-6, 6 surcos de 5 m de largo con una separación entre surcos de 0.8 m = (5m*4.8m), 6 parcelas (Dos tratamientos con MON-ØØ6Ø3-6 y 4 repeticiones).

(4) Superficie MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6, 6 surcos de 5 m de largo con una separación entre surcos de 0.8 m = (5m*4.8m), 6 parcelas (Dos tratamientos con MON-ØØ6Ø3-6 y 4 repeticiones).

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.

Distancia de Aislamiento

Se tendrá una distancia de aislamiento de cualquier otra parcela donde se siembre maíz de 500 metros.

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 convencional, control de insectos convencional.
2) Maíz **MON-ØØ6Ø3-6**, control de maleza convencional control de insectos convencional
3) Maíz **MON-ØØ6Ø3-6**, control de maleza 2 L Faena Fuerte con Transorb® en etapa V2 a V4 + 2 L Faena Fuerte con Transorb® V6 a V8, control de insectos convencional
4) Maíz **MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6**, control de maleza 2 L Faena Fuerte con Transorb® en etapa V2 a V4+ 2 L Faena Fuerte con Transorb® V6 a V8, control de insectos convencional.
5) Maíz **MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6**, control de maleza convencional, control de insectos convencional.

* Control convencional de insectos plagas = aplicación de insecticida solamente cuando el 20% de las plantas se encuentren infestadas por cogollero en estadio larval 4 o superior; por debajo de dicho estadio se deberá realizar un nuevo muestreo para decidir sobre la aplicación de insecticida.

Variables de estudio (datos a obtener).

A. Respecto del carácter de tolerancia a herbicida:

- % 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)
- Calificación de fertilidad (% llenado de mazorca) (1-5; 1 = totalmente fértil, 5 = totalmente estéril)
- Malezas presentes en el ensayo (0 DDAT)
- % control de maleza (15 DDAT)
- altura de planta y mazorca (a madurez fisiológica)
- acame (al final)

Toma de muestras de los tratamientos 3 al 7 para cuantificar niveles de glifosato y AMPA en forraje, elote fresco y grano. Para forraje se tomará una planta por repetición antes de antesis y se homogenizará para obtener una sub-muestra de 0.5 kg a remitir para análisis; las plantas provendrán de los surcos #´s 3 y 6. Para elote se tomará uno por cada repetición en estado lechoso masoso. Para grano se tomará 0.5 kg de surcos centrales una vez determinado el rendimiento. Las muestras se enviarán con hielo seco, incluyendo la de grano, al laboratorio.

B. Respecto del carácter de resistencia a insectos plaga:

- % de plantas con daño foliar bajo infestación natural
- Calificación del daño foliar: escala de 1 a 9; 1 = sin daño al follaje, 9 = daño severo (Escala de Davis).
- % de plantas con daño foliar

- A cosecha:
  % tallos dañados por barrenador
  Extensión de las galerías
  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 eliminado.

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 el ciclo de cultivo siguiente.

Análisis de datos

El modelo estadístico propuesto, un diseño de bloques al azar, será analizado empleando el programa SAS® 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.

® SAS is a registered trademark of SAS Institute, Inc.

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:

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

Reporte Final

El Director (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.