

Cuaderno Técnico nº 2

**SEGURIDAD DEL MAÍZ MON 810 (YIELDGARD®)
GENÉTICAMENTE PROTEGIDO CONTRA TALADROS**



INDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	5
Caracterización molecular del maíz MON 810.....	8
Niveles de proteína CryIAb en las plantas de maíz MON 810.....	9
Seguridad de la proteína CryIAB.....	10
Evaluación de la composición y valor nutritivo del maíz YieldGard®	15
Calidad del grano.....	23
Impacto del cultivo de variedades YieldGard® sobre el medio ambiente.....	25
Beneficios.....	31
Conclusiones	32
Bibliografía	33

RESUMEN

Utilizando modernas técnicas de biotecnología, Monsanto ha desarrollado la línea de maíz MON 810, a partir de la cual se han derivado las variedades de maíz YieldGard protegidas contra taladros. Estas variedades producen la proteína natural CryIAb, de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que las protege de los daños causados por *Ostrinia nubilialis*, *Diatraea grandiosella* y las especies de *Sesamia*.

La proteína CryIAb, producida en las variedades YieldGard se une a receptores específicos en el tubo digestivo de los insectos susceptibles, pero es inocua para los mamíferos y resto de insectos, que carecen de dichos receptores. Así, la proteína CryIAb posee una toxicidad selectiva para un grupo específico de lepidópteros, pero es inofensiva para el hombre, el resto de la fauna terrestre y acuática y los insectos auxiliares que ayudan al control de otras plagas. Las proteínas *Bt* se han utilizado con un historial impecable de seguridad durante casi 40 años, como ingredientes de insecticidas de origen microbiano.

La seguridad de la proteína CryIAb en las variedades de maíz YieldGard ha sido evaluada extensamente. Estas evaluaciones han confirmado que la proteína está presente en muy bajo nivel en el grano y en los alimentos derivados, es rápidamente degradada en fluidos gástricos simulados, carece de similitud con alérgenos conocidos y no muestra efecto negativo sobre los animales, cuando es ingerida en altas cantidades.

Los análisis para determinar la composición del grano y del forraje del maíz YieldGard, producido en diferentes zonas y durante varios años, muestran que los niveles de los nutrientes principales en el maíz YieldGard son comparables a los niveles encontrados en los respectivos híbridos convencionales de maíz. Por otra parte, la seguridad de los piensos producidos con maíz YieldGard ha sido confirmada mediante ensayos de alimentación animal. Estos estudios muestran que los animales crecen y se desarrollan de forma similar si se alimentan con productos de maíz convencional o con los de sus respectivas variedades YieldGard.

Las variedades YieldGard poseen una susceptibilidad a enfermedades y resto de rasgos agronómicos similares a sus respectivas variedades convencionales, de las que se han derivado. En diferentes ensayos se ha

podido comprobar que el grano procedente de las variedades YieldGard ofrecía una mejor calidad, al reducirse el daño por insectos en las mazorcas (una de las principales vías por las que los hongos infectan el grano) y también se ha podido comprobar una reducción en las pérdidas causadas por algunas plagas de almacén.

Las evaluaciones para comprobar su seguridad medioambiental muestran que el maíz YieldGard carece de efecto sobre los insectos beneficiosos desde el punto de vista agronómico, incluyendo abejas, coccinélidos, crisopas u otros insectos depredadores y arañas. Es poco probable que las variedades de maíz YieldGard ocasionen un efecto negativo sobre las poblaciones de mariposa Monarca en EEUU, dada la exposición limitada que se ha podido comprobar en condiciones de campo. Por otra parte, la proteína CryIAb producida en estas variedades se degrada rápidamente en el suelo y carece de efecto sobre invertebrados del suelo, como las lombrices de tierra y los colémbolos.

La revisión de estos estudios demuestra que la proteína CryIAb es segura para el hombre, los animales, los organismos no objeto de la protección y los insectos beneficiosos. Así como que el forraje y grano derivado de las variedades YieldGard es tan seguro y nutritivo como el de sus respectivas variedades convencionales.

INTRODUCCIÓN

La producción agrícola actual se basa en el cultivo de un número reducido de especies vegetales, domesticadas por el hombre a lo largo de muchos siglos, de tal forma que en la mayoría de los casos las variedades actualmente cultivadas se extinguirían en pocos años si los agricultores dejaran de cultivarlas. Esta domesticación consiste en una serie de modificaciones genéticas naturales, que el hombre ha seleccionado de forma empírica, seguidas de nuevas modificaciones buscadas y obtenidas mediante cruzamientos dirigidos, hibridaciones, mutaciones, duplicaciones de cromosomas, etc., que en diferentes cultivos se utilizan y consumen sin problemas.

Utilizando modernas técnicas de biotecnología, Monsanto ha desarrollado la línea de maíz MON 810, a partir de la cual se han derivado las variedades de maíz YieldGard protegidas contra taladros. Estas variedades producen la proteína natural CryIAb, de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que las protege de los daños causados por los taladros del maíz, nombre común con el que se designa en Europa a *Ostrinia nubilalis* y las especies de *Sesamia*. En EEUU y otras zonas maíceiras, esta protección también se extiende a *Diatraea grandiosella*, otra especie plaga de importancia agronómica.

Tanto *O. nubilalis* como las especies de *Sesamia* son plagas de importancia agronómica en nuestro país y en el caso de la primera especie, es una de las plagas más importantes, en las principales zonas productoras de maíz de EEUU (Dicke y Guthrie, 1988). Ambas especies tienen la particularidad de desarrollarse en el interior de las cañas del maíz, lo que dificulta la efectividad de los métodos de protección basados en la aplicación de insecticidas.



Larva de *Sesamia nonagrioides* en el interior de la caña de maíz y daños característicos de los taladros

El número de generaciones que se suceden en el campo es variable de 1 a 3 según la zona geográfica, aunque en la mayoría de las zonas maiceras de nuestro país suele tener al menos dos generaciones por año.

Los daños y pérdidas ocasionadas por los taladros dependen del estado fenológico del cultivo y de la intensidad del ataque, siendo mucho más importantes si el ataque se produce en los primeros estadios del maíz. En todos los casos, la alimentación de las orugas sobre la médula de las cañas disminuye la capacidad de producción de las plantas y las hace muy vulnerables a la caída por lluvia o viento. En EEUU, se ha estimado que las pérdidas ocasionadas por *O. nubilalis* varían del 3 al 7% por cada larva en cada planta, lo cual se estima que supone unas pérdidas anuales entre 37 y 172 dólares (41-191 euros) por hectárea de maíz (Sanders y otros, 1998). En España se estima que los taladros afectan de forma endémica a unas 80.000 ha de maíz, observándose frecuentemente pérdidas medias de cosecha superiores al 11% (Fernández-Anero y otros, 1999).

Los beneficios de cultivar maíz protegido contra taladros engloban: 1) un método efectivo de protección contra estas plagas; 2) una forma de proteger al maíz de los taladros mientras se respeta a las especies beneficiosas; 3) una herramienta para reducir del uso de insecticidas de síntesis (Rice y Pilcher, 1999); 4) y por tanto, para reducir la exposición de los aplicadores a los insecticidas químicos; 5) un elemento más para conseguir un manejo integrado de plagas y sistemas agrícolas más sostenibles; 6) una vía para reducir los niveles de micotoxinas y fumonisinas en los granos de maíz (Munkvold y otros, 1999; Masoero y otros, 1999) y 7) una disminución de los requerimientos de maquinaria o trabajos adicionales, necesarios para la protección del cultivo, lo que permite a los agricultores pequeños y grandes, un mejor aprovechamiento del tiempo y de los recursos.

El desarrollo de la metodología de transformación del maíz (Fromm y otros, 1990), creó la oportunidad de proteger a las plantas de maíz de los daños causados por la alimentación de los taladros, utilizando genes aislados de la bacteria *B. thuringiensis*. La secuencia codificante de *cryIAb* (Höfte y Whiteley, 1989) fue aislada de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (B.t.k.), cepa HD-1, presente en el producto comercial DIPEL®, el producto líder de los preparados microbianos, para uso en agricultura. Diversos laboratorios han desarrollado líneas de maíz transgénico que producen proteínas del tipo

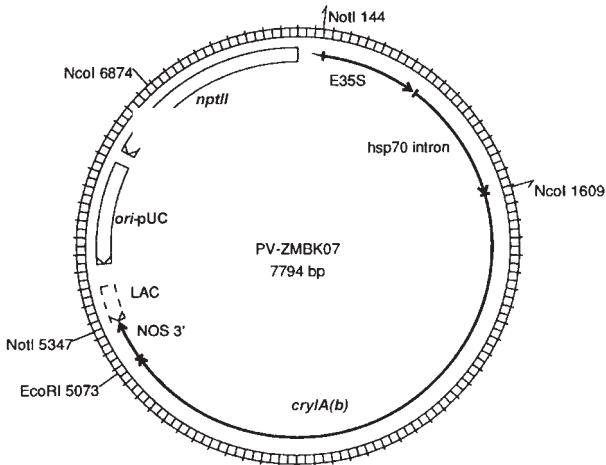
CryIA (Hill y otros, 1995; Armstrong y otros, 1995). Una de las líneas obtenidas por este proceso fue la línea MON 810, a partir de la cual se han derivado las variedades de maíz YieldGard protegidas contra taladros. Estas variedades fueron comercializadas en EEUU, en 1997, por primera vez, y desde entonces, se han cultivado unos 13 millones de hectáreas. Con posterioridad, otros países se han ido sumando a su autorización, entre ellos Argentina y la Unión Europea. Así, el cultivo y consumo de maíz derivado de la línea MON 810 fue aprobado en la UE, con fecha 22 de Abril de 1998 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas del 5/5/1998, página L 131/32-33).

Las evaluaciones sobre la seguridad de estas variedades para el medio ambiente, para su consumo, o utilización en fabricación de piensos, han sido un paso previo necesario para obtener las aprobaciones en los principales países productores o importadores de maíz, donde se ha solicitado su autorización. Estas evaluaciones incluyen la caracterización del producto, que abarca desde el análisis molecular del ADN insertado, la caracterización de la proteína y determinación de los niveles de expresión en los tejidos del maíz; evaluación de la seguridad de la proteína; análisis de los componentes alimentarios, para establecer la equivalencia substancial con las variedades comerciales, y la evaluación medioambiental para asegurar que de su cultivo no se deriven efectos negativos para el medio ambiente (Sanders y otros, 1998). Además de los estudios realizados por Monsanto, existen numerosos artículos revisados y publicados en revistas científicas, que apoyan la conclusión del mínimo riesgo de las variedades de maíz YieldGard que expresan la proteína CryIAb (Pilcher y otros, 1997; Aulrich y otros, 1998; Daenicke y otros, 1999). Con base en estas evaluaciones, diversos comités científicos de todo el mundo han expuesto sus conclusiones, como el Comité Científico de Plantas de la Comisión Europea, cuya opinión fue presentada y expuesta en internet el 10/2/98 (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out02_en.html), concluyendo que no hay evidencia de que la línea MON 810 vaya a causar efectos adversos en la salud humana o el medio ambiente. Esta opinión ha sido ratificada en un nuevo dictamen el 24 de septiembre de 1999, después de que Austria invocara el artículo 16 como consecuencia de las publicaciones sobre la mariposa monarca (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out49_en.html).

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MAÍZ MON 810

La línea de maíz MON 810 fue desarrollada mediante el método biolístico, utilizando el plásmido PV-ZMBK07 (Figura 1) y tejido embriogénico de maíz (Armstrong y otros, 1991). El plásmido PV-ZMBK07 contiene la secuencia del gen *cryIAb*, que codifica a la proteína CryIAb, con actividad insecticida. La secuencia codificante de *cryIAb* procedente de *B. thuringiensis* subsp. HD-1 (Fischhoff y otros, 1987), fue modificada para optimizar los niveles de expresión de la proteína CryIAb, en planta. El promotor 35S mejorado, procedente del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Kay y otros, 1987; Odell y otros, 1985) y el intrón de maíz *hsp70* (Rochester y otros, 1986) regulan la expresión de la secuencia codificante de *cryIAb*. La región no traducida 3', del gen de la nopalina sintasa (NOS), aislada del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, termina la transcripción y dirige la poliadenilación del ARN mensajero (ARNm) (Fraley y otros, 1983). El plásmido también contiene la secuencia codificante de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) (Beck y otros, 1982), que codifica a un marcador bacteriano seleccionable, utilizado para identificar las células de maíz transformadas, durante el proceso de desarrollo.

Figura 1. Plásmido utilizado para producir el evento MON 810, del que derivan las variedades YieldGard



Los análisis de tipo Southern con el evento MON 810 demostraron que existe una única copia funcional de la secuencia codificante de *cryIAb*, en el genoma del maíz. La secuencia que codificaba a *nptII* no se integró durante la transformación.

Se ha comprobado que la secuencia codificante de *cryIAb* tiene una herencia de tipo mendeliano y se transmite a través del polen, lo que demuestra su integración estable en el ADN del núcleo. Durante el programa de mejora con los híbridos comerciales de maíz, se ha mantenido la integridad del inserto.

NIVELES DE PROTEÍNA CryIAB EN LAS PLANTAS DE MAÍZ MON 810

Con objeto de conocer la cantidad de ingrediente activo, presente en la línea MON 810, se han medido los niveles de proteína CryIAb en varios tejidos del maíz. Estas determinaciones también sirven para calcular los niveles a los que se espera que sean expuestos los organismos no objeto del control y el hombre, así como para apoyar la dosis efectiva, elemento del manejo de la resistencia, y para demostrar la estabilidad de la proteína codificada, durante el proceso de mejora.

Los niveles de proteína CryIAb se midieron a partir de muestras de cuatro ensayos de campo diferentes: ensayos realizados en EEUU durante los años 1994 y 1995 y ensayos en Europa en 1995 y 1996. Se desarrolló un ensayo tipo ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) que fue validado para cuantificar los niveles de la proteína CryIAb en varios tejidos de la planta. Los niveles de proteína CryIAb en los tejidos de plantas de maíz YieldGard, derivadas del evento MON 810, han sido consistentes a lo largo de varios años de evaluación en EEUU y Europa (Tabla I). La consistencia en los niveles de proteína CryIAb, a lo largo de los años del ciclo de mejora, apoyan la estabilidad del inserto, un componente importante de la eficacia del producto. Los niveles de proteína CryIAb, han demostrado ser suficientes, en EEUU, para ofrecer protección efectiva frente a la primera y segunda generación del taladro *O. nubilialis* (Gianessi y Carpenter, 1999). De igual forma se ha podido comprobar que estos niveles son suficientes para ofrecer un control efectivo de los taladros del maíz *O. nubilialis* y *Sesamia spp.* en nuestro país (Fernández-Anero y otros, 1999).

Tabla 1. Niveles de expresión de la proteína CryIAb en plantas de maíz YieldGard (mg/g peso fresco de tejidos)

Tejido Vegetal	Parámetro	EEUU 1994 (6 localidades)	EEUU 1995 (5 localidades)	UE 1995 (4 localidades)	UE 1996 (3 localidades)
Hojas ¹	Media	9.35	8.95	8.60	12.15
	Desv. típica	1.03	2.17	0.74	3.86
	Rango	7.93-10.34	5.21-10.61	7.59-9.39	7.77-15.06
Forraje / Planta completa ²	Media	4.15	3.34	4.80	4.88
	Desv. típica	0.71	1.09	0.75	0.52
	Rango	3.65-4.65	2.31-4.48	4.11-5.56	4.32-5.34
Grano ¹	Media	0.31	0.57	0.53	0.41
	Desv. típica	0.09	0.21	0.12	0.06
	Rango	0.19-0.39	0.39-0.91	0.42-0.69	0.35-0.46
Hojas a lo largo del ciclo de cultivo ³					
(1 ^a)	Media	9.78			
(2 ^a)	Media	8.43			
(3 ^a)	Media	4.91			

¹ Las medias se calcularon a partir de los análisis de muestras vegetales de cada una de las localidades.

² Para los ensayos realizados en EEUU, en 1994, los valores representan el análisis de la planta completa. Para los ensayos restantes, los valores representan el análisis de tejidos para forraje. Las plantas completas se recolectaron dos semanas después de la polinización; las muestras de forraje fueron recogidas en el estado de "masa blanda" o "comienzo de indentación". Las medias se determinaron a partir del análisis de muestras de plantas de una localidad en EEUU y todos los lugares en la UE. Cada muestra vegetal estaba constituida por una mezcla de dos plantas.

³ Medias de un grupo de hojas recogidas en intervalos de dos semanas, desde el estado V4 del maíz hasta polinización, en una localidad.

SEGURIDAD DE LA PROTEÍNA CryIAB

Las evaluaciones para determinar la seguridad de la proteína CryIAb abarcan desde la caracterización de la proteína, digestión en fluidos gástricos e intestinales simulados, toxicidad aguda y crónica en ratón, comparación de la secuencia de aminoácidos con toxinas y alérgenos conocidos y efectos sobre especies no objetivo. Debido a que los niveles de proteína CryIAb producidos en el maíz son extremadamente bajos, fue necesario producir suficientes cantidades de proteína CryIAb mediante fermentación bacteriana, en *Escherichia coli*, para poder realizar los estudios sobre su seguridad. La equivalencia funcional y físico-química entre la proteína producida en *E. coli* y la producida en las variedades YieldGard fue previamente demostrada,

justificándose por tanto, el uso de CryIAb producida en *E. coli* en la evaluación de su seguridad (Lee y otros, 1995).

Modo de acción de CryIAb y especificidad

El modo de acción de las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis*, tales como la proteína CryIAb ha sido extensamente estudiado y revisado (Gill y otros, 1992; English y Slatin, 1992; Yamamoto y Powell, 1993; Knowles, 1994; Dean y otros, 1996). Para que la proteína CryIAb produzca su efecto insecticida, debe ser ingerida por los insectos susceptibles (Huber y Lüthy, 1981). Tras la ingestión, las toxinas de tipo CryI (peso molecular ~134 KD) se solubilizan y son procesadas proteolíticamente en medio básico hasta quedar el núcleo proteico que posee la actividad tóxica (peso molecular ~63 KD). Después de atravesar la membrana peritrofica del tubo digestivo medio del insecto, las toxinas de tipo Cry se unen selectivamente a receptores específicos, localizados en los bordes vellosos del epitelio del tubo digestivo medio (Hofmann y otros, 1988a y b). Tras esta unión se forman poros que rompen el flujo de iones existente en el tubo digestivo, lo cual conlleva a la parálisis de su tubo digestivo y a la muerte de los insectos susceptibles.

La proteína CryIAb posee una actividad insecticida únicamente para insectos pertenecientes al orden Lepidoptera. Así, en un estudio sobre el rango de huéspedes, se determinó que sólo siete de dieciocho especies de insectos eran sensibles a las proteínas CryIAb y CryIAc, siendo las siete especies lepidópteros (Macintosh y otros, 1990). Esta especificidad es atribuible directamente a la presencia de receptores específicos para la proteína CryIAb en los insectos diana (Hofman y otros, 1988a; Van Rie y otros, 1990).

Se ha demostrado que no hay receptores para las proteínas delta-endotoxinas de las subespecies de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de los mamíferos. Por lo tanto, el hombre no es susceptible a estas proteínas (Sacchi et al., 1986; Hofmann y otros, 1988b; Noteborn y otros, 1995). Por otra parte, las numerosas revisiones sobre la seguridad de las proteínas Bt y un largo historial de uso seguro de los productos microbianos que las contienen avalan la ausencia de efectos adversos en humanos (Ignoffo, 1973; Shaddock, 1983; Siegel y Shaddock, 1989; McClintock y otros, 1995).

Digestión de la proteína CryIAb en fluidos gástricos e intestinales simulados.

Dado que la proteína CryIAb debe ser procesada por proteasas digestivas para poseer su actividad insecticida (Huber y Lüthy, 1981), en los estudios de digestión simulada, se utilizó el núcleo resistente a la digestión por tripsina, de la proteína CryIAb (peso molecular ~63KD). En los fluidos gástricos simulados, que contienen la enzima pepsina, se comprobó que la proteína CryIAb se degradaba rápidamente. Así, mediante análisis de tipo Western se comprobó que más del 90% de la proteína CryIAb se degradaba en los dos minutos siguientes a la incubación en fluidos gástricos simulados. La bioactividad de la proteína CryIAb, medida por bioensayos con insectos, también desaparece rápidamente; entre el 74 y el 90% de la bioactividad de la proteína CryIAb se disipa a los dos minutos de incubación en fluidos gástricos simulados, el punto de medición más temprano. Para poner en perspectiva la rápida degradación de la proteína CryIAb en el sistema digestivo simulado, se estima que aproximadamente el 50% de la comida sólida tarda dos horas en vaciarse del estómago humano, mientras que los líquidos necesitan aproximadamente 25 minutos (Sleisenger y Fordtran, 1989). A partir de los análisis tipo western y de bioactividad con insectos, se ha comprobado que en fluidos intestinales, que contienen tripsina y otras proteasas, el núcleo resistente a tripsina de la proteína CryIAb, no alcanza una degradación substancial hasta pasadas 19,5 horas de incubación. Estos resultados eran predecibles considerando que está documentado que el núcleo resistente a tripsina de estas y otras proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* es relativamente resistente a la digestión por las serín-proteasas, como la tripsina, una de las principales proteasas en los fluidos intestinales (Bietlot y otros, 1989).

Ausencia de toxicidad oral aguda en ratón.

Para comprobar la toxicidad aguda oral de la proteína CryIAb, se realizó un estudio en ratón. Se considera que un estudio sobre la toxicidad aguda es apropiado ya que las proteínas tóxicas sólo poseen efectos agudos (Sjoblad y otros, 1992). La proteína CryIAb fue administrada oralmente cebando a tres grupos de diez ratones, hembras y machos. Adicionalmente, se suministraba a un grupo de ratones el mismo medio sin la proteína CryIAb. Las dosis de proteína CryIAb administradas a los ratones fueron 0, 400, 1000 y 4000 mg/kg. El grupo de ratones control recibió albúmina de suero bovino (BSA) a la dosis de 4000 mg/kg. En el momento del sacrificio, 7 días tras la administración, no había

diferencias estadísticas en la mortalidad, peso, ganancia de peso o consumo de alimento, entre el grupo control BSA y los grupos tratados con proteína CryIAb. Los resultados de este estudio muestran que la proteína CryIAb carece de efecto tóxico agudo sobre los mamíferos, como era esperable. La mayor dosis evaluada en este estudio con ratones es aproximadamente 20 millones de veces superior a la posible exposición que podría recibir el hombre, a través de la dieta.

Falta de similitud de secuencia de la proteína CryIAb con proteínas tóxicas conocidas

Otra vía para evaluar el potencial efecto tóxico de una proteína introducida en una planta es comparar la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, con la de proteínas tóxicas conocidas. Las proteínas homólogas, derivadas de un antecesor común, comparten con bastante probabilidad la función. Así, es indeseable introducir ADN que codifique a una proteína que sea homóloga de una toxina.

Se han utilizado criterios publicados (Doolittle, 1990), que usan el grado de similitud en los aminoácidos entre proteínas, para evaluar si la proteína CryIAb es homóloga a toxinas conocidas. Basándose en este procedimiento, se determinó que la proteína CryIAb no muestra similitud significativa en su secuencia de aminoácidos cuando se compara con secuencias de proteínas tóxicas conocidas, incluidas en las bases de datos de proteínas PIR, EMBL, SwissProt y GenBank, con excepción de otras proteínas Cry.

Falta de homología de la proteína CryIAb con alérgenos conocidos.

Cuando se evalúa el potencial alergénico de una proteína, el factor más importante es si la fuente del gen introducido en la planta es alergénica (FDA, 1992; Metcalfe y otros, 1996). *B. thuringiensis*, la fuente del gen cryIAb, carece de un historial relacionado con reacciones alérgicas. En los casi 40 años de uso comercial, se desconocen casos documentados de alergia a *B. thuringiensis*, incluyendo la posible alergia asociada a la fabricación de productos que contengan *B. thuringiensis* (McClintock y otros, 1995).

Además, el perfil bioquímico de la proteína CryIAb ofrece una base para la evaluación de la alergenicidad cuando se compara con proteínas que constituyen alérgenos conocidos. Los alérgenos proteicos deben ser estables a la digestión por pepsina y tripsina en las condiciones ácidas del sistema

digestivo, ya que tienen que pasar a través de la mucosa intestinal para desencadenar la respuesta alérgica. Otro factor que contribuye significativamente a la alergenicidad de las proteínas es una alta concentración en la comida, que desencadene la respuesta alérgica (Taylor y otros, 1987; Taylor, 1992; Taylor y otros, 1992; y Metcalfe y otros, 1996). De acuerdo con estas características, la prevalencia y propiedades fisico-químicas de la proteína CryIAb son claramente diferentes de las características de los alérgenos conocidos.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de una proteína introducida con la secuencia de aminoácidos de alérgenos conocidos es también un indicador útil del potencial alergénico (Metcalfe y otros, 1996). Esta referencia define un test de comparación de secuencias de relevancia inmunológica para averiguar la similitud entre la secuencia de aminoácidos de la proteína introducida y la de conocidos alérgenos, en una coincidencia de al menos ocho aminoácidos idénticos continuos.

La secuencia completa de aminoácidos de la proteína CryIAb se ha comparado con las secuencias de aminoácidos de 219 alérgenos, presentes en las bases de datos genéticas de dominio público (GenBank, EMBL, PIR, y SwissProt), utilizando el programa de ordenador FASTA (Pearson y Lipman, 1988). El resultado de estas comparaciones es que no se encontraron secuencias de significado inmunológico, u homologías alergénicas, con ninguno de ellos (Dootlittle, 1990) en la proteína CryIAb (Metcalfe y otros, 1996). Concluyéndose que: (1) el gen *cryIAb* introducido en el maíz no codifica a un alérgeno conocido y (2) la proteína introducida no comparte ninguna secuencia de aminoácidos de significado inmunológico con los alérgenos conocidos.

En resumen, la proteína CryIAb ha demostrado carecer de homología de secuencia con las toxinas conocidas, distintas de las proteínas Cry, y es rápidamente degradada, con pérdida de la actividad insecticida, bajo las condiciones que simulan la digestión de los mamíferos. Carece de indicadores de toxicidad, medidos por posibles efectos adversos relativos al tratamiento en ratones a los que se había administrado en el alimento proteína CryIAb. El gen *cryIAb* no se deriva de una fuente alergénica y la proteína CryIAb, carece de similitud en secuencias de importancia inmunológica con conocidos alérgenos, y en las características de dichas proteínas. Estos estudios apoyan la seguridad de la proteína CryIAb y son

completamente consistentes con la historia extensiva del uso seguro de la proteína CryIAb, que posee una alta selectividad para los insectos, con falta de efectos deletéreos para otros tipos de organismos como los mamíferos, peces, aves o invertebrados (EPA, 1998; McClintock y otros, 1995).

EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y VALOR NUTRITIVO DEL MAÍZ YieldGard

El diseño de un programa para la evaluación de la seguridad del alimento y pienso derivados de una línea mejorada por ingeniería genética requiere un detallado conocimiento de los usos del cultivo y de los productos derivados en nutrición humana y animal. Aproximadamente el 80% de todo el maíz producido en los EEUU se utiliza para fabricación de piensos destinados a la producción ganadera, avícola y piscícola (NCGA, 2000). El maíz también se procesa de forma abundante para utilización en alimentación y productos industriales, que incluyen productos tales como cereales para desayuno, bebidas dulces, aperitivos, comida para niños, pasta de dientes, lápices de colores, pañales para niños, productos cosméticos y farmacéuticos. (NCGA, 2000). El maíz tiene un sabor agradable, es rápidamente digerido por el hombre y por los animales monogástricos y rumiantes, y entre los granos, es una de las mejores fuentes de energía metabolizable (Wright, 1988). Teniendo en cuenta que el maíz es la mayor fuente de alimentos y piensos en todo el mundo, se han realizado una amplia variedad de estudios para demostrar la seguridad del maíz YieldGard protegido contra taladros, tanto para su uso como alimento como para fabricación de piensos.

Las nuevas variedades de maíz desarrolladas por mejora convencional son generalmente seleccionadas por su potencial de producción, con pocas o ninguna evaluación de los parámetros nutricionales. El maíz empleado en piensos es complementado con proteína, minerales y vitaminas para alcanzar los requerimientos nutricionales de los animales. La seguridad en alimentación puede ser confirmada demostrando que el nuevo alimento es substancialmente equivalente al alimento convencional (es decir, tan seguro como el alimento convencional). El establecimiento de la equivalencia substancial es un componente importante de la evaluación de la seguridad de los alimentos (OECD, 1993; WHO, 1995; FAO/WHO, 1996).

Tras realizar los análisis correspondientes se pudo determinar que la composición de las variedades YieldGard es substancialmente equivalente a la de sus respectivas variedades de maíz comercial. Se han realizado análisis sobre la composición del grano cosechado en ensayos realizados en 1994, en EEUU, y en 1995, en la UE (Tablas 2-5) y sobre el forraje cosechado en ensayos durante 1995 en la UE (Tabla 6). Los resultados de estos análisis para las variedades de maíz YieldGard, derivadas del evento MON 810, se compararon con los de las líneas control, así como con los datos existentes en la literatura publicada.

Los parámetros medidos sobre muestras de grano incluyen proteínas, grasas, cenizas, fibra cruda, fibra (detergente neutro y detergente ácido) y humedad, así como aminoácidos, ácidos grasos, calcio, fósforo y tocoferol (vitamina E). Los valores de carbohidratos fueron determinados sustrayendo del 100% la suma los porcentajes de proteína, grasa, cenizas y humedad. Las muestras de forraje se analizaron para el primer grupo de variables.

Los valores de los parámetros medidos en grano (Tabla 2) se encontraban todos en el rango de valores publicados en la literatura (Jugenheimer, 1976; Watson, 1987). No había diferencias estadísticas para los niveles de proteína, grasa, cenizas, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y carbohidratos en el control y en el evento MON 810. Se observaron diferencias estadísticas para la fibra cruda, en los ensayos realizados en 1994, en EEUU y para la humedad, en los ensayos realizados en la UE, en 1995. La diferencia en el contenido en humedad es poco probable que posea significado sobre el valor nutritivo, dado que depende del periodo de secado empleado en cada localidad. El contenido en fibra cruda del evento MON 810 fue aprox. 8% menor que el de la línea control. Esta pequeña diferencia es bastante improbable que tenga un significado biológico, dado que se encuentra dentro del rango de variabilidad que se cita en la literatura sobre el contenido en fibra del maíz.

Tabla 2. Resumen de los análisis de composición de grano de maíz

Componente	1994 EEUU.		1995 UE		Intervalo Publicado
	Media ^a (Intervalo ^b)		Media ^c (Intervalo ^d)		
	MON 810	MON 818 ^e	MON 810	MON 820 ^e	
Proteína ^f	13.1 (12.7-13.6)	12.8 (11.7-13.6)	11.5 (10.5-12.2)	10.8 (9.0-11.8)	6.0-12.0 ^g 9.7-16.1 ^h
Grasa ^f	3.0 (2.6-3.3)	2.9 (2.6-3.2)	3.0 (2.8-3.3)	3.0 (2.4-3.3)	3.1-5.7 ^g 2.9-6.1 ^h
Cenizas ^f	1.6 (1.5-1.7)	1.5 (1.5-1.6)	1.4 (1.3-1.5)	1.4 (1.2-1.6)	1.1-3.9 ^g
Fibra cruda ^f	2.6 ⁱ (2.5-2.8)	2.4 (2.3-2.5)	N.A. ⁱ	N.A.	2.0-5.5 ^k
Fibra, detergente neutro ^f	N.A.	N.A.	12.1 (10.7-13.9)	12.4 (9.6-15.3)	8.3-11.9 ^g
Fibra, detergente ácido ^f	N.A.	N.A.	3.4 (2.7-4.1)	3.9 (3.1-5.3)	3.3-4.3 ^g
Carbohidratos ^f	82.4 (81.8-82.9)	82.7 (81.7-83.8)	84.1 (83.1-84.8)	84.9 (83.7-86.3)	No indicado
Humedad %	12.4 (11.0-14.4)	12.0 (10.6-14.2)	13.3 ⁱ (12.1-15.2)	12.1 (11.6-12.3)	7-23 ^g

^a Los valores indicados corresponden a la media de seis muestras, cada una de ellas procedente de un campo.

^b El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos en las seis localidades, para cada línea.

^c Los valores indicados corresponden a la media de cuatro muestras, cada una de ellas procedente de un campo.

^d El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos en las cuatro localidades.

^e Línea control en el ensayo.

^f Peso seco en porcentaje de la muestra.

^g Watson, 1987.

^h Jugenheimer, 1976.

ⁱ N.A., no analizado.

^j Diferencias estadísticas respecto a la línea control en el intervalo de confianza del 95%

^k Watson, 1982.

Los resultados del análisis de la composición de aminoácidos del grano se encuentran resumidos en la Tabla 3. Los valores para 15 de 18 aminoácidos, se encuentran dentro del rango de valores publicados en la literatura (Watson, 1982).

Tabla 3. Composición en aminoácidos del grano de maíz^a

Aminoácido	1994 EEUU.		1995 UE		Intervalo publicados ^g
	Media ^b (Intervalo) ^c		Media ^d (Intervalo) ^e		
	MON 810	MON 818 ^f	MON 810	MON 820 ^f	
Metionina	1.7 (1.6-1.9)	1.7 (1.6-1.7)	1.4 ^h (1.4-1.5)	1.5 (1.4-1.7)	1.0-2.1
Cisteína	2.0 ^h (1.9-2.1)	1.9 (1.8-2.0)	1.9 (1.9-2.1)	2.1 (1.9-2.4)	1.2-1.6
Lisina	2.8 (2.5-2.9)	2.8 (2.7-2.9)	2.9 (2.7-3.1)	3.1 (2.6-3.5)	2.0-3.8
Triptofano	0.6 ^h (0.5-0.7)	0.6 (0.4-0.6)	0.5 ^h (0.4-0.5)	0.6 (0.5-0.7)	0.5-1.2
Treonina	3.9 (3.7-4.4)	3.8 (3.7-3.9)	3.7 (3.6-3.7)	3.7 (3.3-3.8)	2.9-3.9
Isoleucina	3.7 (3.3-4.1)	3.8 (3.6-4.0)	3.8 (3.4-4.3)	3.9 (3.7-4.3)	2.6-4.0
Histidina	3.1 ^h (2.9-3.3)	2.9 (2.8-3.0)	3.0 (2.9-3.0)	3.1 (2.9-3.2)	2.0-2.8
Valina	4.5 (4.1-4.9)	4.6 (4.3-4.8)	4.7 (4.4-4.9)	4.8 (4.4-4.9)	2.1-5.2
Leucina	15.0 (14.1-16.7)	14.5 (13.8-15.0)	14.5 (13.9-15.3)	14.2 (13.3-15.3)	7.8-15.2
Arginina	4.5 (4.1-4.7)	4.5 (4.2-4.7)	3.9 (3.6-4.1)	4.1 (3.8-4.3)	2.9-5.9
Fenilalanina	5.6 ^h (5.4-6.1)	5.4 (5.2-5.6)	5.6 (5.4-5.9)	5.6 (5.3-6.0)	2.9-5.7
Glicina	3.7 (3.4-4.0)	3.7 (3.5-3.8)	3.5 (3.4-3.7)	3.6 (3.2-3.9)	2.6-4.7
Alanina	8.2 ^h (7.8-8.9)	7.8 (7.5-8.0)	8.2 (7.9-8.4)	8.1 (7.5-8.6)	6.4-9.9
Acido aspártico	7.1 (6.4-8.2)	6.6 (6.3-6.8)	7.1 (6.9-7.3)	6.9 (6.4-7.3)	5.8-7.2
Acido glutámico	21.9 (20.4-24.4)	21.1 (20.1-21.6)	21.3 (20.8-21.8)	20.9 (19.5-22.1)	12.4-19.6
Prolina	9.9 ^h (9.7-10.5)	9.6 (9.4-9.8)	9.7 (9.5-9.9)	9.7 (9.2-10.1)	6.6-10.3
Serina	5.5 ^h (5.3-5.9)	5.2 (5.1-5.4)	5.5 (5.4-5.6)	5.3 (4.9-5.5)	4.2-5.5
Tirosina	4.4 ^h (4.1-4.8)	4.0 (3.9-4.1)	4.0 (3.9-4.2)	4.0 (3.7-4.3)	2.9-4.7

^a Los valores indicados corresponden al porcentaje sobre la proteína total.

^b Los valores indicados corresponden a la media de seis muestras, una procedente de cada campo.

^c El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos para cada línea, en las seis localidades

^d Los valores indicados corresponden a la media de cuatro muestras, una procedente de cada campo.

^e El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos para cada línea en las cuatro localidades

^f Línea control en el ensayo.

^g Watson, 1982. Los valores corresponden al porcentaje sobre la proteína total [10.1% (Nx6.25)].

^h Diferencias estadísticas respecto a la línea control en el intervalo de confianza del 95%.

Los valores para los aminoácidos cisteína, histidina y ácido glutámico son significativamente superiores al rango que se encuentra en las publicaciones existentes, tanto para el evento MON 810 como para la línea control. Esto es probablemente debido a las diferencias en la metodología de análisis. En el grano procedente de los ensayos realizados en EEUU, en 1994, no existían diferencias significativas entre el evento MON 810 y la línea control para 10 de 18 aminoácidos. Sin embargo, los valores para ocho aminoácidos (cisteína, triptófano, histidina, fenilalanina, alanina, prolina, serina y tirosina) eran significativamente mayores en el evento MON 810 que en la línea control. En el grano procedente de los ensayos en la UE, en 1995, no había diferencias estadísticamente significativas para 16 de 18 aminoácidos. Sin embargo, los niveles de metionina o triptófano era significativamente inferiores en MON 810, comparados con los del grano control. Las pequeñas diferencias medidas, con excepción del triptófano, no fueron consistentes a lo largo de varios años y diferentes geografías. Los valores de triptófano en el grano de MON 810 eran significativamente superiores a aquellos en el grano de la línea control en los ensayos realizados en 1994 en EEUU, pero significativamente inferiores que en la línea control en los ensayos en la UE en 1995. De modo que, estas diferencias inconsistentes seguramente carecen de significado biológico.

La composición de ácidos grasos del grano de la línea MON 810 y de la línea control se resumen en la Tabla 4. Se excluyeron de la evaluación estadística diez ácidos grasos, cuyos valores se encontraban cerca del límite de detección del ensayo (araquidónico, caprílico, cáprico, eicosadienoico, eicosatrienoico, heptadecenoico, láurico, mirístico, miristoleico, y pentadecanoico). También, se excluyen los datos para cuatro ácidos grasos (palmitoleico, araquídico, eicosenoico y béhenico), cuyos valores eran muy bajos (< 0.4% del total de ácidos grasos), y cuyos valores en las líneas MON 810 y control mostraban muy pequeñas diferencias. No se encontraron diferencias con significado estadístico para cuatro de los cinco ácidos grasos presentes en el grano en los ensayos realizados en 1995, en la UE. El ácido palmítico era significativamente mayor en el grano de la línea MON 810 (~3%) comparado con el grano del control. Esta pequeña diferencia es poco probable que posea un significado biológico dado que no fue consistente a lo largo de varios años y se encuentra dentro del rango de variación publicado en la literatura.

Tabla 4. Composición en ácidos grasos del grano de maíz^a

Acido Graso	1994 EEUU.		1995 UE		Intervalo Publicado ^g
	Medi ^a (Intervalo) ^c		Medi ^a (Intervalo) ^e		
	MON 810	MON 818 ^f	MON 810	MON 820 ^f	
Palmitico (16:0)	10.5 (10.2-11.1)	10.5 (10.2-10.7)	10.5 ^h (10.3-10.8)	10.3 (9.9-10.7)	7-19
Estearico (18:0)	1.9 (1.7-2.1)	1.8 (1.8-1.9)	1.5 (1.4-1.7)	1.5 (1.4-1.6)	1-3
Oleico (18:1)	23.2 (21.5-25.4)	22.8 (21.6-23.9)	22.0 (21.0-22.9)	22.4 (21.8-23.5)	20-46
Linoleico (18:2)	62.6 (59.5-64.7)	63.0 (61.8-64.6)	64.0 (63.3-64.6)	64.0 (62.7-65.1)	35-70
Linolenico (18:3)	0.8 (0.7-0.9)	0.9 (0.8-0.9)	1.1 (1.0-1.1)	1.0 (1.0-1.1)	0.8-2

^a Los valores indicados corresponden al porcentaje sobre el total de lípidos. Los ácidos grasos no listados se encontraban por debajo del límite de detección del ensayo.

^b Los valores indicados corresponden a la media de seis muestras, una procedente de cada campo.

^c El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos para cada línea, en las seis localidades

^d Los valores indicados corresponden a la media de cuatro muestras, una procedente de cada campo.

^e El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos para cada línea en las cuatro localidades

^f Línea control en el ensayo.

^g Watson, 1982.

^h Diferencias estadísticas respecto a la línea control en el intervalo de confianza del 95%.

Los valores para los componentes minerales, calcio, fósforo y tocoferol (vitamina E) se reflejan en la Tabla 5. Los valores para el fósforo y la vitamina E se encontraban entre los valores publicados; sin embargo, los valores para el contenido en calcio, tanto para MON 810 como para la línea control, se encontraban por debajo del rango publicado en la literatura. Esto puede ser atribuible a las diferencias en el método analítico, con interferencias de otros elementos como el fósforo, en los antiguos procedimientos de evaluación (Sidhu y otros, 2000). El nivel de calcio en MON 810 era significativamente mayor que en la línea control en los ensayos realizados en 1994, en EEUU, pero no mostraban diferencias estadísticas en los ensayos realizados en 1995, en la UE. Esta inconsistencia en los resultados sugiere que las diferencias observadas en los ensayos realizados en 1994, en EEUU, carecen probablemente de significado biológico. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de fósforo en la línea MON 810 y en la línea control.

Tabla 5. Tocoferol, calcio y fósforo en el grano de maíz^a

	1994 EEUU		Intervalo Publicado ^d
	Media ^b (Intervalo) ^c		
	MON 810	MON 818	
Tocoferol (Vit E) mg/kg	10.4 (9.7-11.3)	10.9 (9.9-12.1)	3.0-12.1
Calcio %	0.0036 ^e (0.0033-0.0039)	0.0033 (0.0029-0.0037)	0.01-0.1
Fósforo %	0.358 (0.334-0.377)	0.348 (0.327-0.363)	0.26-0.75

^a Valores en peso seco.

^b Los valores indicados corresponden a la media de seis muestras, una procedente de cada campo.

^c El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos para cada línea, en las seis localidades

^d Watson, 1982.

^e Diferencias estadísticas respecto a la línea control en el intervalo de confianza del 95%

Los resultados de los análisis en el forraje recogido en los ensayos de campo de la UE en 1995 se presentan en la Tabla 6. No hubo diferencias significativas en los valores de grasas, cenizas, fibra (detergente neutro), fibra (detergente ácido), carbohidratos y contenido en materia seca, entre la línea MON 810 y la línea control. Se observó un incremento estadísticamente significativo en el nivel de proteína del forraje de MON 810 comparado con la línea de control. Sin embargo, estas diferencias carecen de significado biológico dado que se encuentran dentro del rango de valores históricos para forraje.

Para demostrar además la equivalencia nutricional de los híbridos de maíz YieldGard y otros híbridos de maíz Bt, se han completado múltiples estudios de alimentación animal. Los resultados de estos estudios demuestran que los animales crecen y se desarrollan de manera comparable cuando se alimentan con maíz Bt, a cuando lo hacen con productos de maíz convencional. Específicamente, en un ensayo con pollos alimentados sobre maíz Bt, no se encontraron diferencias en crecimiento o eficiencia de alimentación comparados con aquellos que se alimentaban sobre productos de maíz convencional (Aulrich y otros, 1998); tampoco se observaron diferencias en la ingestión de pienso, producción de leche, composición de leche y sanidad de las ubres cuando se alimentaron vacas lecheras lactantes

Tabla 6. Resumen de los análisis de composición del forraje

Componente	1995 EEUU		Intervalo Histórico ^d
	Media ^a (Intervalo) ^b		
	MON 810	MON 820 ^c	
Proteína ^e	7.3 ^f (5.7-8.4)	6.1 (4.8-7.4)	4.8-8.4
Grasa ^e	1.4 (1.3-1.7)	1.8 (1.4-2.1)	1.4-2.1
Cenizas ^e	3.2 (3.1-3.6)	3.4 (2.9-4.4)	2.9-5.1
Fibra, detergente neutro ^e	38.4 (36.9-41.4)	41.5 (39.9-43.3)	39.9-46.6
Fibra, detergente ácido ^e	24.7 (22.6-27.2)	27.3 (25.6-29.2)	21.4-29.2
Carbohidratos ^e	88.0 (86.9-89.8)	88.8 (88.0-89.1)	84.6-89.1
Materia seca %	30.0 (28.7-32.4)	28.7 (26.5-31.3)	26.5-31.3

^a Los valores indicados corresponden a la media de cuatro muestras, una procedente de cada campo.

^b El intervalo indica los valores individuales más bajos y más altos para cada línea, en las cuatro localidades

^c Los valores indicados corresponden a la media de dos grupos de medidas. La línea control es MON 820

^d Intervalo para las líneas control, sembradas en los campos de ensayo de Monsanto Co entre 1993 y 1995 (Sidhu y otros, 2000).

^e Porcentaje en peso seco de cada muestra.

^f Diferencias estadísticas respecto a la línea control en el intervalo de confianza del 95%.

con maíz Bt o con maíz convencional recogido en verde y picado (Faust y Miller, 1997); asimismo, la digestibilidad en ganado vacuno alimentado sobre ensilado a partir de maíz Bt, o convencional, era similar (Daenicke y otros, 1999); y en el primer año de un estudio de dos años, que se puso en marcha con ganado vacuno para carne, no se encontraron diferencias en el rendimiento entre los que se alimentaron con tallos de maíz Bt o maíz convencional (Russell y Petersen, 1999).

Los datos sobre la composición del grano y del forraje confirman que la línea de maíz MON 810 es substancialmente equivalente al híbrido parental, así como a los híbridos tradicionales de maíz. Es poco probable que el procesamiento altere la composición del maíz y por tanto, los productos derivados del grano de maíz serán también substancialmente equivalentes a,

y tan seguros como, los actuales productos derivados del maíz. Los estudios sobre el rendimiento de animales, además, confirman que las variedades YieldGard y otras variedades de maíz Bt son tan completas y nutritivas como el maíz convencional.

Los datos de composición presentados a las autoridades del Reino Unido (ACNFP) sirvieron de base para permitir la notificación –autorización para consumo, con el correspondiente etiquetado– de acuerdo con el Artículo 5 del Reglamento CE 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 26/6/1998, pág C 200/16).

CALIDAD DEL GRANO

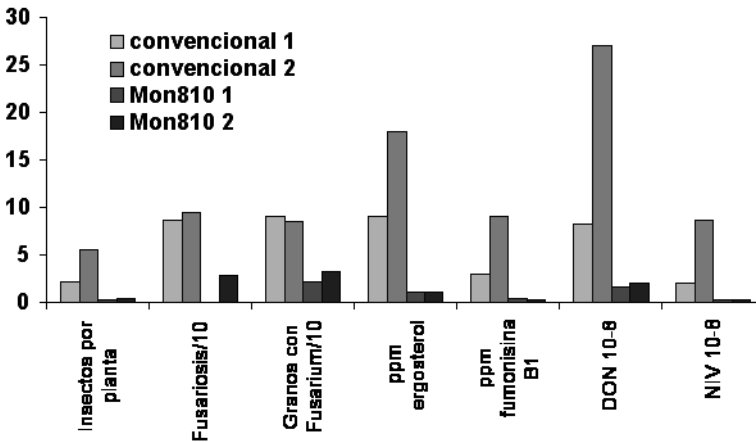
En condiciones de ataques de taladros a las mazorcas, el maíz YieldGard ha demostrado mejorar la calidad del grano, lo cual además contribuye a mejorar la seguridad del maíz para fabricación de piensos y alimentos. Los investigadores han confirmado que el maíz YieldGard reduce los daños por insectos en las mazorcas del maíz, una de las principales vías por las que el hongo *Fusarium moniliforme* infecta al grano (Munkwold y otros,



1997). *Fusarium* produce fumonisinas, una clase de micotoxinas peligrosas para los animales y el hombre, que pueden causar leucoencefalomalacia al ganado equino, síndrome de edema pulmonar en ganado porcino, y que ha sido asociada a cáncer de esófago en humanos (Sobek y Munkwold, 1999).

Las investigaciones realizadas por la Universidad de Iowa y el Departamento de Agricultura de EEUU en el cinturón del maíz, en el medio Oeste americano, entre 1995 y 1998, muestran que los híbridos de maíz YieldGard, que expresan la proteína Cry1Ab, reducen los niveles de podredumbres en mazorca y niveles de fumonisinas en el grano, hasta en un 90 al 93%, comparados con los híbridos no Bt. (Munkwold y otros., 1997; Munkwold y otros, 1999; Masoero y otros, 1999). La menor contaminación por micotoxinas en granos protegidos con la proteína Bt ha sido constatada en Francia y España (Cahagnier y Melcion, 2000) y también en Italia (Pietri y Piva, 2000).

Presencia de *Fusarium* y micotoxinas en maíz grano cultivado en dos localidades españolas (datos de Cahagnier y Melcion, 2000)



El maíz YieldGard ha demostrado también mejorar la calidad del grano reduciendo las pérdidas por algunas plagas de almacén susceptibles a la proteína CryIAb. Los investigadores de la Universidad del estado de Kentucky (Sedlacek y otros, 1999) encontraron que el maíz YieldGard reducía la supervivencia de las larvas de dos plagas de almacén importantes, las polillas *Plodia interpunctella* y *Sitotoga cerealella*, en aproximadamente un 80%. Además, los insectos que conseguían sobrevivir, tenían afectada su fertilidad, con una producción mermada de huevos de entre el 70 y 80%, lo que reducía la extensión de las poblaciones de estas plagas.

IMPACTO DEL CULTIVO DE VARIEDADES YieldGard SOBRE EL MEDIO AMBIENTE.

Existe una extensa información sobre la carencia de efectos de las preparaciones microbianas de cepas de *B.t.k.*, que contienen la proteína CryIAb (Melin y Cozzi, 1990). La secuencia completa de la proteína CryIAb, codificada por el gen *cryIAb*, empleado en las variedades YieldGard, y la forma activa, producida en el intestino de los insectos tras su ingestión, son idénticas a las respectivas, cadena completa y forma activa, de la proteína CryIAb contenida en las formulaciones microbianas, que cuentan con un historial de uso seguro, durante casi 40 años. Las proteínas CryIAb de *B.t.k.* son extremadamente selectivas para los insectos lepidópteros (Dulmage, 1981; Klausner, 1984; Aronson y otros, 1986; Whiteley y Schenepf, 1986; MacIntosh y otros, 1990), uniéndose específicamente a receptores del tubo digestivo medio de los insectos susceptibles (Wolfersberger y otros, 1986); Hofmann y otros, 1988^a; Hofmann y otros, 1988b; Van Rie eta al., 1989; Van Rie y otros, 1990) y carecen de efectos perjudiciales sobre insectos auxiliares, beneficiosos o en general no objetivo para la protección del cultivo, incluyendo depredadores y parasitoides de plagas de lepidópteros o abejas (*Apis mellifera*) (Cantwell y otros, 1972; Krieg y Langenbruch, 1981; Flexner y otros, 1986; EPA, 1988; Vinson, 1989; y Melin y Cozzi, 1990).

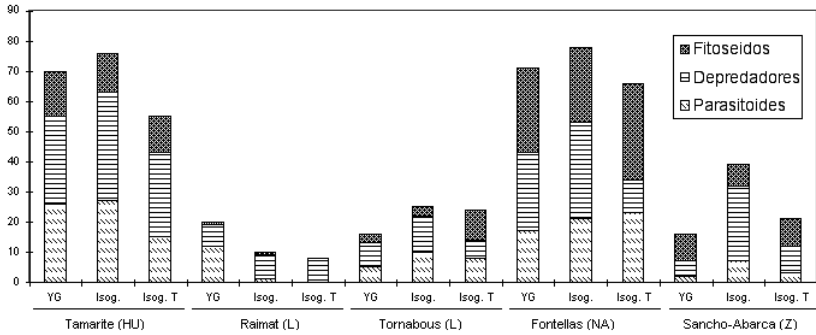
Para confirmar y expandir los resultados de los productos de origen microbiano, que contienen una proteína CryIAb idéntica a la producida en el maíz YieldGard, se ha evaluado el efecto potencial de dicha proteína sobre un grupo representativo de organismos no objeto de la protección. Estos estudios se realizaron con el núcleo resistente a tripsina de la proteína CryIAb, o forma

activa, dado que se trata de la porción con actividad insecticida. Las especies no objetivo, incluidas en estos estudios fueron larvas y adultos de abeja (*Apis mellifera*), un insecto polinizador beneficioso para el hombre; larvas de crisopa (*Chrysopa carnea*), un insecto auxiliar, depredador de otras plagas; un himenóptero parásito de la mosca doméstica (*Brachymeria intermedia*); una coccinela (*Hippodamia convergens*), insecto auxiliar depredador; y una lombriz de tierra (*Eisenia fetida*). Además, se realizó una evaluación sobre colémbolos (*Folsomia candida*), una especie no objetivo del suelo, estudio para el cual se utilizaron hojas de plantas derivadas de la línea MON 810. Debido a la potencial exposición de invertebrados acuáticos al polen de maíz que contuviera la proteína CryIAb, también se realizó un ensayo de toxicidad con *Daphnia magna*. Los resultados de los estudios con estos organismos no objetivo, muestran que la mortalidad de las especies de insectos no Lepidópteros y de otros tres organismos representativos, expuestos a la proteína CryIAb, no difieren significativamente de la mortalidad del control.

Además de los citados estudios, no se han observado efectos negativos agudos sobre tres especies de depredadores (*Coleomegilla maculata*, *Orius insidiosus* y *Chrysoperla carnea*) expuestos al polen de plantas que expresaban la proteína CryIAb (Pilcher y otros, 1997). Tampoco se observaron efectos sobre *Folsomia candida* y *Oppia nitens* cuando se alimentaron con hojas de algodón que contenían las proteínas CryIAb y CryIAc (Yú y otros, 1997). Y en ensayos de campo realizados en 1994, no se encontraron diferencias en la oviposición de *O. nubilialis* y su depredación o parasitismo por enemigos naturales, cuando se compararon las muestras encontradas en plantas de maíz que expresaban la proteína CryIAb y su respectivo control (Orr y Landis, 1997).

El seguimiento de las poblaciones de insectos auxiliares en los ensayos y parcelas demostrativas durante 1998 y 1999 en España, ha mostrado igualmente una distribución ajena a la expresión de esta proteína, sin que ninguna de las especies más abundantes y recogidas en los conteos se mostrara afectada por este tipo de maíz (Figuras 2 y 3). Estos resultados confirman la seguridad de la proteína CryIAb para las especies no objetivo.

Fig.2. Número medio de artrópodos auxiliares en variedades de maíz resistentes a taladros y sus respectivas líneas isogénicas en diferentes campos de ensayo, durante 1998.

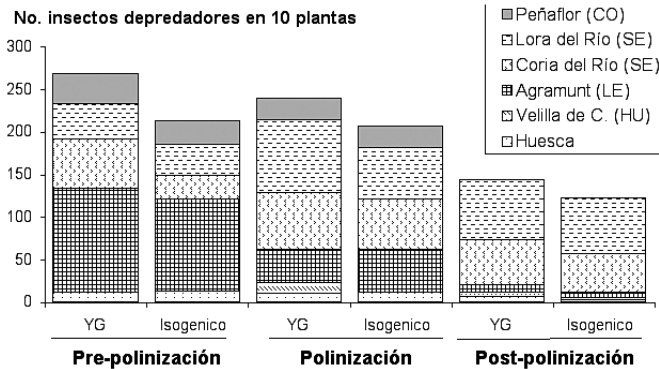


Los valores representados para depredadores y parasitoides indican el número medio de insectos recogidos en aspiraciones de dos minutos (2-4/9/98) en los lineos centrales de las parcelas sembradas con una variedad resistente a taladros, YieldGard (YG), su variedad isogénica (Isog.) y ésta última protegida contra taladros mediante aplicación de insecticidas.

Los valores indicados para los ácaros fitoseidos representan el número de individuos recogidos en 5 hojas utilizando un embudo tipo Berlesse (26-31/8/98).

El tratamiento insecticida de las parcelas tratadas (T) consistió en una aplicación de deltametrina 2.5% (0.5 l/ha), con fecha 17-30/6/98, en el estado de maíz 8-10 hojas.

Fig 3. Número medio de insectos depredadores beneficiosos en variedades de maíz resistentes a taladros (YG) y sus respectivas líneas isogénicas, durante 1999.



Los valores representan el número medio en cuatro muestras de 10 plantas en cada parcela y localidad antes de la polinización, durante plena polinización y tras ésta.

En un famoso estudio de laboratorio, se indicó que las larvas de mariposa Monarca, *Danaus plexippus*, son susceptibles a la proteína CryIAb, que se encuentra en el polen del maíz Bt (Losey y otros, 1999). Para verificar estos potenciales efectos, se han llevado a cabo numerosos trabajos de campo, cuyos resultados han sido presentados en el Symposium sobre Mariposa Monarca y en dos Talleres celebrados en 1999 y 2000. Para entender mejor el impacto del polen del maíz Bt sobre la mariposa Monarca se han realizado investigaciones en cinco áreas: 1) biología de la mariposa Monarca, 2) movimiento del polen, 3) niveles de polen necesarios para afectar a las larvas, 4) distribución de la lechetrezná huésped (*Asclepias spp.*), y 5) el impacto del clima. Los resultados de estos trabajos demuestran que la exposición de las mariposas Monarca y otra especie de gran colorido y vistosidad, *Papilio polyxenes*, al polen de maíz en condiciones de campo es muy bajo (Sears y otros, 2000a; VVraight y otros, 2000). Los investigadores han concluido que:

- 1) la migración de la mariposa Monarca y la deposición del polen pueden no coincidir,
- 2) las Monarcas prefieren depositar sus huevos en lechetreznas que no están cerca de los campos de maíz,
- 3) el polen de maíz es bastante pesado y no viaja mucho más allá de los campos de maíz (> 90% se deposita en los 5 primeros metros del perímetro del campo (Sears y otros, 2000a),
- 4) el polen de YieldGard sobre las hojas, a densidades de hasta de 1100 granos/cm², no tiene efecto sobre el peso de las larvas de mariposa Monarca o su supervivencia (Hellmich y otros, 2000a) y
- 5) la densidad de lechetreznas es mayor en las cunetas que en los campos de maíz.

Los resultados de los ensayos realizados durante el año 2000 encontraron además, que las larvas de Monarca sobrevivían y se desarrollaban normalmente sobre lechetreznas que se encontraban en los campos de maíz Bt durante el período de polinización (Anderson y otros, 2000; Hellmich y otros, 2000b; Sears y otros, 2000b).

Recientemente, acaban de ser publicados los resultados de cinco nuevos estudios de campo para evaluar el riesgo del maíz Bt para la mariposa Monarca. En ellos se ha podido confirmar que las variedades de maíz derivadas de la línea MON 810 son tan seguras para las larvas de Monarca

como las variedades convencionales (Hellmich y otros, 2001; Pleasants y otros 2001; Oberhauser y otros, 2001; Stanley-Horn y otros, 2001; Sears y otros, 2001).

Además de comprobar el potencial efecto de la proteína CryIAb sobre especies de organismos no objetivo, se han realizado diversas evaluaciones para confirmar la esperable rápida degradación de la proteína CryIAb en el suelo. Los restos de las plantas de maíz que quedaron tras la cosecha, fueron incorporados al suelo mediante labores o permanecieron en la superficie del mismo (en sistema de no laboreo), dependiendo de las prácticas de manejo del suelo tras la cosecha, que se practicaban en cada localidad. La tasa de degradación de la proteína CryIAb fue medida mediante el decrecimiento de la actividad insecticida de las hojas de maíz YieldGard incubadas en el suelo. En estos trabajos se pudo comprobar que la proteína CryIAb, como componente de los tejidos del maíz, tiene una TD₅₀ (tiempo en el que la bioactividad se reduce al 50%) y TD₉₀ (tiempo en el que la bioactividad se reduce al 90%) de 1.6 y 15 días, respectivamente (Sims y Holden, 1996). Esta medida del ritmo de degradación, en el suelo, es comparable a la citada para la proteína de *B.t.k.* en algodón modificado genéticamente (Palm y otros, 1994) y a la tasa de degradación citada para los productos Bt de origen microbiano (West y otros, 1984; West, 1984; y Pret y otros, 1980). Esta rápida degradación refuerza por otra parte, la carencia de efectos deletéreos sobre organismos no objetivo del suelo.

En una reciente publicación, se ha citado que proteínas Bt aisladas pueden unirse a partículas de arcilla y ácidos húmicos, en mezclas de suelos artificiales, de forma que se podría reducir su degradación, al tiempo que la proteína Bt todavía retendría parte de su actividad insecticida (Crecchio y Stotzky, 1998). Los autores deducían que las proteínas Bt producidas en variedades transgénicas podrían así entrar en el suelo por las labores posteriores al cultivo, o por procesos como la exudación, y unirse a partículas en el suelo, acumulándose hasta niveles que podrían ser tóxicos para los organismos del suelo. Sin embargo, estas deducciones se contradicen con los datos que muestran que la proteína CryIAb, expresada en las plantas de maíz YieldGard, y otras proteínas Bt, son rápidamente degradadas en el suelo (ver párrafo anterior). Estos datos, combinados con la especificidad de las proteínas Bt, y la ausencia de efectos ecológicos adversos, apoyan la conclusión de que es bastante improbable que las proteínas Bt tengan un efecto adverso sobre los organismos del suelo.

Los entomólogos han observado que las poblaciones de insectos se adaptan a los insecticidas si dichos insecticidas no se manejan adecuadamente. El manejo integrado de plagas se desarrolló como resultado de las experiencias de la industria con insecticidas químicos. Para responder a las mismas preocupaciones, relativas al maíz transgénico, resistente a taladros, Monsanto introdujo un plan de manejo de la resistencia de los taladros (IRM) en el cultivo de variedades de maíz YieldGard, en EEUU en 1997, coincidiendo con el lanzamiento comercial de este producto.

Para retrasar la aparición de resistencias en las poblaciones de taladros y maximizar la sostenibilidad del maíz YieldGard, el plan de IRM incluye los siguientes puntos:

- 1) expandir el conocimiento de la biología y ecología de los taladros;
- 2) disponer de un producto con una dosis efectiva, que controla prácticamente todos los insectos heterocigotos resistentes;
- 3) mantener refugios, o campos sembrados con variedades convencionales (en un 20% de la superficie), para mantener poblaciones de insectos susceptibles a CryIAb;
- 4) poner en marcha un programa de seguimiento para detectar cualquier incidencia de resistencia y en caso de confirmarse ésta implementar un plan de contención;
- 5) promover el empleo de otras prácticas de manejo integrado de plagas, que favorezcan la diversidad del ecosistema y la utilización de diversas tácticas para el control de insectos;
- 6) poner en marcha un programa de formación de los agricultores para asegurar la correcta implementación de estas estrategias; y
- 7) desarrollar productos con modos de acción alternativos.

La implementación de este plan, durante los pasados años ha dado sus frutos, sin que se haya registrado hasta el momento un cambio en la sensibilidad de la resistencia a la proteína CryIAb. Las bases para la implementación de un plan similar en España han comenzado por el establecimiento de la sensibilidad a Bt de las poblaciones iniciales (González-Núñez y otros, 2000).

Las evaluaciones desde el punto de vista medioambiental muestran que el maíz YieldGard carece de efectos perjudiciales sobre insectos auxiliares

y beneficiosos desde el punto de vista agronómico, incluyendo abejas, coccinélidos, crysopas o insectos depredadores y arañas. Es poco probable que el maíz YieldGard posea un impacto significativo sobre las poblaciones de mariposa monarca, debido a su limitada exposición. Por otra parte, la proteína CryIAb, producida en el maíz YieldGard, se degrada rápidamente en el suelo y carece de efecto sobre los invertebrados del suelo, incluyendo las lombrices de suelo y los colémbolos.

BENEFICIOS

Aunque no es el propósito de esta publicación el análisis y cuantificación de beneficios, existen numerosas publicaciones disponibles que ilustran el valor aportado por las variedades YieldGard derivadas de MON 810 y las razones de su aceptación por los agricultores. En zonas con ataques endémicos de taladros, la disponibilidad de variedades de maíz genéticamente protegidas contra orugas contribuye a importantes aumentos de producción (10,5% de media en los ensayos de Monsanto en España) sin necesidad de aplicar insecticidas para esta plaga.

El aumento en la producción es positivo para el medio ambiente, pues con la seguridad antes descrita reduce las necesidades de agua, suelo, fertilizantes y otros recursos necesarios para obtener cada Tm. de maíz.

CONCLUSIONES

Las variedades de maíz YieldGard han demostrado ofrecer un control eficaz de los taladros del maíz, primero en ensayos de campo que se vienen realizando desde 1993, y posteriormente en la experiencia comercial, con millones de hectáreas cultivadas, desde 1997. El ADN insertado en la línea MON 810, que contiene el gen cryIAb, ha sido incorporado mediante cruzamientos a diversos híbridos comerciales de maíz, dando lugar a las variedades de maíz YieldGard, con el objetivo de combinar la protección frente a taladros con un potencial de alto rendimiento agronómico y adaptación a diversas condiciones de cultivo. Las detalladas evaluaciones de la seguridad de su cultivo para el medio ambiente y de sus productos para la fabricación de piensos o alimentos confirman la seguridad de este producto y han apoyado su aprobación en múltiples países. Los análisis incluyen: 1) una detallada caracterización molecular del ADN introducido; 2) evaluación de la seguridad de la proteína CryIAb expresada, 3) análisis de la composición del grano de maíz y forraje y 4) evaluación del impacto medioambiental de las plantas de maíz. Estos estudios han demostrado que la proteína CryIAb es segura para el hombre, los animales, los organismos no objetivo y los insectos auxiliares y que el grano y el forraje derivado de las variedades YieldGard es tan seguro y nutricional como el de las variedades de maíz convencionales.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, P., HELLMICH, R., Y LEWIS, L. 2000. Bt pollen and monarch butterflies: research update. Joint Annual Meeting: Entomological Society of Canada and Entomological Society of America, Dec 3-6, 2000. *To be published*.
- ARMSTRONG, C. L., GREEN, C. E., Y PHILLIPS, R. L. 1991. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 65:92-93.
- ARMSTRONG, C.L., PARKER, G.B., PERSHING, J.C., BROWN, S.M., SANDERS, P.R., DUNCAN, D.R., STONE, T., DEAN, D.A., DEBOER, D.L., HART, J., HOWE, A.R., MORRISH, F.M., PAJEAU, M.E., PETERSEN, W.L., REICH, B.J., RODRIGUEZ, R., SANTINO, C.G., SATO, S.J., SCHULER, W., SIMS, S.R. STEHLING, S. TAROCHIONE, L.J. Y FROMM, M.E. 1995. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Science* 35(2):550-557.
- ARONSON, A.I., BECKMAN, W., Y DUNN, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50(1):1-24.
- AULRICH, K., HALLE, I, Y FLACHOWSKY, G. 1998. Ingredients and digestibility of corn kernels of the Cesar species and the genetically altered Bt-hybrids in laying hens. 1998 Conference Book, VDLUFA-Schriftenreihe.
- BECK, E., LUDWIG, G., AUERSWALD, E.A., REISS, B. Y SCHALLER, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19:327-336.
- BIETLOT, H., CAREY, P.R., CHOMA, C., KAPLAN, H., LESSARD, T. Y POZSGAY, M. 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem. J.* 260:87-91.
- CAHAGNIER, B. Y MELCION D., 2000. Mycotoxines de *Fusarium* dans les maïs-grains a la recolte: relation entre la presence d'insectes (pyrale, sesamie) et la teneur en mycotoxines. *Proc. 6th Int. feed Production Conference, Piacenza: 237-249.*
- CANTWELL, G.E., LEHNERT, T., Y FOWLER, J. 1972. Are biological insecticides harmful to the honey bee? *Am. Bee J.* 112: 294-296.
- CRECCHIO, C. Y STOTZKY, G. 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biol. Biochem.* 30(4), 463-470.
- DAENICKE, R., GADEKEN, D., Y AULRICH, K. 1999. Use of silo corn of conventional species and the genetically altered Bt-hybrids in cattle feeding fattened cows. 12th Corn Colloquium, Wittenberg.
- DEAN, D. H., RAJAMOHAN, F., LEE, M.K., WU, S.J., CHEN, X.J., ALCANTARA, E. Y HUSSAIN, S.R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis- a minireview. *Gene* 179:111-117.
- DG XXIV. 1998. Opinión of the Scientific Committee on plants Regarding the Genetically Modified, Insect Resistant Maize Lines Notified by the Monsanto Company. Ver en Internet: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out02_en.html
- DICKE, F.F. Y GUTHRIE, W.D. 1988. The most important corn insects. In *Corn and Corn Improvement Third Edition*. G.F. Sprague and J.W. Dudley (ed). American Society of Agronomy Inc., Madison, WI. Pp 769-880.
- DOOLITTLE, R.F. 1990. Searching through sequence databases. In *Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences. Methods in Enzymology* 183:109.
- DULMAGE, H.T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In *Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980*. Burges, H.D., Ed., Academic Press, London, pp. 193-222.

- ENGLISH, L. Y SLATIN, S.L. 1992. Mini-review. Mode of action of Delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. Insect Biochem. Molec. Biol. 22(1):1-7.
- EPA. 1988. Guidance for the reregistration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. NTIS PB 89-164198.
- FAO/WHO. 1996. Biotechnology and food safety. Report of a Joint JAO/WHO Consultation, Rome, Italy, 30 September - 4 October 1996. FAO, Food and Nutrition Paper 61.
- FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Fed. Regist. (USA) 57: 22984-23005.
- FAUST, M. Y MILLER, L. 1997. Study finds no *Bt* in milk (Abstr.). Iowa State University Integrated Crop Management Newsletter IC-478, Special Livestock Edition.
- FERNÁNDEZ-ANERO, J., NOVILLO, C. Y COSTA, J. 1999.: MaisGard, protección contra taladros en toda la planta, durante toda la campaña. Resultados en España 1997-1998. 6° *Symposium Nacional de Sanidad Vegetal*. Colección Congresos y Jornadas 48/98. pp 447-455. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- FISCHHOFF, D.A., BOWDISH, K.S., PERLAK, F.J., MARRONE, P.G., MCCORMICK, S.M., NIEDERMEYER, J.G., DEAN, D.A., KUSANO-KRETZMER, K., MAYER, E.J., ROCHESTER, D.E., ROGERS, S.G. Y FRALEY, R.T. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/technology 5:807-813.
- FLEXNER, J.L., LIGHTHART, B. Y CROFT, B.A. 1986. The effects of microbial pesticides on non-target beneficial arthropods. Agric. Ecosys. Environ. 16:203-254.
- 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., Y WOO, S.C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807.
- FROMM, M.E., MORRISH, F., ARMSTRONG, C., WILLIAMS, R., THOMAS, J., Y KLEIN, T.M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Bio/Technology 8:833-839.
- GIANESSI, L.P. Y CARPENTER, J.E. 1999. Agricultural Biotechnology: Insect Control Benefits. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington, D.C.
- GILL, S.S., COWLES, E.A. Y PIETRANTONIO, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37:615-636.
- GONZÁLEZ-NÚÑEZ, M., ORTEGO, F. Y CASTAÑERA, P., 2000. Susceptibility of spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. J. Econ. Entomology, 93: 459-463.
- HELLMICH, R.L., SIEGFRIED, B.D., SEARS, M.K., STANLEY-HORN, D.E., DANIELS, M.J., MATTILA, H.R., SPENCER, T., BIDNE, K.G., LEWIS, L.C., 2001. Monarch Larvae Sensitivity to *Bacillus thuringiensis* Purified Proteins and Pollen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. <http://www.pnas.org/papbyrecent.shtml>
- HELLMICH, R.L., LEWIS, L.C. Y PLEASANTS, J.M. 2000a. Monarch feeding behavior and *Bt* pollen exposure risks to monarchs in Iowa. Presented at the USDA Monarch Workshop, 24-25 Feb 2000, Kansas City, MO. *To be published*
- HELLMICH, R.L., LEWIS, L.C. Y PLEASANTS, J.M. 2000b. Survival of monarch larvae in *Bt* and non-*Bt* field corn. Presented at the USDA Monarch Data Review, 16-17 Nov 2000, Chicago, IL. *To be published*.
- HILL, M., LAUNIS, K., BOWMAN, C., MCPHERSON, K., DAWSON, J., WATKINS, J., KOZIEL, M. Y WRIGHT, M.S. 1995. Biolistic introduction of a synthetic *Bt* gene into elite maize. Euphytica 85:119-123.
- HOFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H.V., HÖFTE, H., VAN RIE, J., JANSSENS, S., Y VAN MELLAERT, H. 1988a. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7844-7848.

- HOFMANN, C., LUETHY, P., HUETTER, R. Y PLISKA, V. 1988b. Binding of the Delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* 173(1):85-91.
- HÖFTE, H. Y WHITELEY, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Reviews* 53:242-255.
- HUBER, H.E. Y LÜTHY, P. 1981. *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin: Composition and activation. In Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Davidson, E.W., Ed., Allanheld, Osmun Publishers, Totowa, New Jersey, pp 209-234.
- IGNOFFO, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 217:141-172.
- JUGENHEIMER, R.W. 1976. Corns for special purposes and uses. In Corn: Improvement, Seed Production, and Uses. John Wiley & Sons, New York, pp 227 and 243.
- KAY, R., CHAN, A., DALY, M. Y MCPHERSON, J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.
- KLAUSNER, A. 1984. Microbial insect control. *Bio/Technology* 2:408-419.
- KNOWLES, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal Delta-endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24:275-308.
- KRIEG, A. Y LANGENBRUCH, G.A. 1981. Susceptibility of Arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In Microbial Control of Pests and Plant Diseases, Burges, H.D., Ed., Academic Press, London, pp 837-896.
- LEE, T.C., ZENG, J., BAILEY, M., SIMS, S.R., SANDERS, P.R. Y FUCHS, R.L. 1995. Assessment of equivalence of insect protected corn- and *E. coli*-produced B.t.k. HD-1 protein. *Plant Physiol. Suppl.* 108:151.
- LOSEY, J.E., RAYOR, L.S., Y CARTER, M.E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*. 399, 6733:214.
- MACINTOSH, S.C., STONE, T.B., SIMS, S.R., HUNST, P.L., GREENPLATE, J.T., MARRONE, P.G., PERLAK, F.J., FISCHHOFF, D.A., Y FUCHS, R.L. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invert. Path.* 56:258-266.
- MASOERO, F., MOSCHINI, M., ROSSI, F., PRANDINI, A., Y PIETRI, A. 1999. Nutritive value, mycotoxin contamination and in vitro rumen fermentation of normal and genetically modified corn (CryIA(B)) grown in northern Italy. *Maydica* 44: 205-209.
- MCCLINTOCK, J.T., SCHAFFER, C.R., Y SJOBLAD, R.D. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45:95-105.
- MELIN, B.E. Y COZZI, E.M. 1990. Safety to nontarget invertebrates of Lepidopteran strains of *Bacillus thuringiensis* and their β -exotoxins. In Safety of Microbial Insecticides, Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, pp 149-168.
- METCALFE, D.D., ASTWOOD, J.D., TOWNSEND, R., SAMPSON, H.A., TAYLOR, S.L. Y FUCHS, R.L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Rev. in Food Science and Nutrition* 36(S):S165-S186.
- MUNKVOLD, G.P., HELLMICH, R.L. Y SHOWERS, W.B. 1997. Reduced Fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology* 87(10):1071-1077.
- MUNKVOLD, G.P., HELLMICH, R.L. Y RICE, L.G. 1999. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Dis.* 83(2):130-138.
- NCGA. 2000. The World of Corn. The National Corn Growers Association.
- NOTEBOORN, H.P.J.M., BIENENMANN-PLOUM, M.E., VAN DEN BERG, J.H.J., ALINK, G.M., ZOLLA, L., REYNAERTS, A., PENZA, M. Y KUIPER, H.A. 1995. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CRYIA(b) expressed in transgenic tomatoes. In ACS Symp. Ser., 605 (Genetically Modified Foods), pp 134-147.

- OBERHAUSER, K.S., PRISBY, M.D., MATTILA, H.R., STANLEY-HORN, D.E., SEARS, M.K., DIVELY, G., OLSON, E., PLEASANTS, J.M., LAM, W.F., HELLMICH, R.L., 2001. Temporal and Spatial Overlap between Monarch Larvae and Corn Pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. <http://www.pnas.org/papbyrecent.shtml>
- ODELL, J.T., NAGY, F.Y. CHUA, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). 1993. Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology: Concepts and principles. OECD, Paris.
- ORR, D.B. Y LANDIS, D.A. 1997. Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *J. Econ. Entomol.* 90(4): 905-909.
- PALM, C.J., DONEGAN, K., HARRIS, D.Y. SEIDLER, R.J. 1994. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology* 3:145-151.
- PEARSON, W.R. Y LIPMAN, D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448.
- PIETRI, A., Y PIVA, G., 2000. Occurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy. *Proc. 6th Int. feed Production Conference, Piacenza*: 226-236.
- PILCHER, C.D., OBRZYCKI, J.J., RICE, M.E. Y LEWIS, L.C. 1997. Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environ. Entomol.* 26(2):448-454.
- PLEASANTS, J.M., HELLMICH, R.L., DIVELY, G.P., SEARS, M.K., STANLEY-HORN, D.E., MATTILA, H.R., FOSTER, J.E., CALRK, T.L., JONES, G.D., 2001. Corn Pollen Deposition on Milkweeds in and near Cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. <http://www.pnas.org/papbyrecent.shtml>
- PRUETT, C.J.H., BURGESS, H.D. Y WYBORN, C.H. 1980. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 35:168-174.
- RICE, M.E. Y PILCHER, C.D. 1999. *Bt* Corn and insect resistance management: Farmer perceptions and educational opportunities. A poster presented at the 1999 meeting of the Entomological Society of America.
- ROCHESTER, D.E., WINER, J.A. Y SHAH, D.M. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO J.* 5:451-458.
- RUSSELL, J. Y PETERSEN, T.S. 1999. *Bt* corn and non-*Bt* corn crop residues equal in grazing value. Iowa State University Extension Communications, Ames, IA.
- SACCHI, V.F., PARENTI, P., HANOZET, G.M., GIORDANA, B., LUTHY, P. Y WOLFERSBERGER, M.G. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris Brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.* 204(2):213-218.
- SANDERS, P.R., LEE, T.C., GROTH, M.E., ASTWOOD, J.D. Y FUCHS, R.L. 1998. Safety assessment of insect-protected corn. In *Biotechnology and Safety Assessment*, 2nd ed; Thomas, J.A. Ed., Taylor and Francis, pp 241-256.
- SEARS, M.K. M HELLMICH, R.L., STANLEY-HORN, D.E., OBERHAUSER, K.S., PLEASANTS, J.M., MATTILA, H.R., SIEGFRIED, B.D., DIVELY, G.P., 2001. Impact of *Bt* Corn Pollen on Monarch Butterfly Populations: A Risk Assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. <http://www.pnas.org/papbyrecent.shtml>
- SEARS, M.K., STANLEY-HORN D.E. Y MATILLA, H.R. 2000a. Preliminary Report on the Ecological Impact of *Bt* Corn Pollen on the Monarch Butterfly in Ontario, submitted March 30, 2000, to Plant Biotechnology Office, Canadian Food Inspection Agency.
- SEARS, M.K., STANLEY-HORN, D.E. Y MATILLA, H.R. 2000b. Impact of *Bt* pollen on 1st and 3rd instar monarchs in field studies. Presented at the USDA Monarch Data Review, 16-17 Nov 2000, Chicago, IL. *To be published.*
- SEDLACEK, J.D., HANLEY, A.M., KOMARAVALLI, S.R., Y PRICE, B.D. 1999. Impact of transgenic grain on Indian meal moth and Angoumois grain moth. Kentucky State University, Frankfort, KY.

- SHADDUCK, J.A. 1983. Some considerations on the safety evaluation of nonviral microbial pesticides. Bull. W.H.O. 61(1):117-128.
- SIDHU, R.S., HAMMOND, B.G., FUCHS, R.L., MUTZ, J.-N., HOLDEN, L.R., GEORGE, B. Y OLSON, T. 2000. Glyphosate-tolerant corn: The composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea Mays L.*). J. Agric. Food Chem. 48(6):2305-2312.
- SIEGEL, J.P.Y SHADDUCK, J.A. 1989. Safety of microbial insecticides to vertebrates-humans. In *Safety of Microbial Insecticides*, Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W., Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 102-113.
- SIMS, S.R. Y HOLDEN, L.R. 1996. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissues. Physio and Chem Ecol 25(3):659-664.
- SJOBLOD, R.D., MCCLINTOCK, J.T. Y ENGLER, R. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. Regulatory Toxicology Pharmacology 15:3-9.
- SLEISENGER, M.H. Y FORDTRAN, J.S. 1989. *Gastrointestinal Disease*. Volume 1, Pathophysiology Diagnosis Management. 4th Edition. W.B. Saunders Co., Toronto, pp 685-689.
- SOBEK, E.A. Y MUNKVOLD, G.P. 1999. European corn borer (*Lepidoptera:Pyralidae*) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. J. Econ. Entomol. 92: 503-509.
- STANLEY-HORN, D.E., DIVELY, G.P., HELLMICH, R.L., MATTILA, H.R., SEARS, M.K., ROSE, R., JESSE, L.C.H., LOSEY, J.E., OBRZYCKI, J.J., LEWIS, J., 2001. Assessing the Impact of CryIAb-Expressing Corn Pollen on Monarch Butterfly Larvae in Field Studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. <http://www.pnas.org/papbyrecent.shtml>
- TAYLOR, S.L., LEMANSKE JR., R.F., BUSH, R.K. Y BUSSE, W.W. 1987. Food allergens: Structure and immunologic properties. Ann. Allergy 59(5), Part II:93-99.
- TAYLOR, S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. Food Technol 39:146-152.
- TAYLOR, S.L., NORDLEE, J.A. Y BUSH, R.K. 1992. Food allergies. In *Food Safety Assessment*, ACS Symposium Series 484. J.W. Finley, S.F. Robinson and D.J. Armstrong, (eds). American Chemical Society, Washington, D.C.
- VAN RIE, J., JANSSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D. Y VAN MELLAERT, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. Eur. J. Biochem. 186:239-247.
- VAN RIE, J., JANSSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D. Y VAN MELLAERT, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 56(5):1378-1385.
- VINSON, S.B. 1989. Potential impact of microbial insecticides on beneficial arthropods in the terrestrial environment. In *Safety of Microbial Insecticides*. Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W., Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 43-64.
- WATSON, S.A. 1982. Corn: Amazing maize. General properties. In *CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture*, Volume II: Part I 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, P.E., Eds., American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, pp. 53-82.
- WEST, A.W., BURGESS, H.D., WHITE, R.J. Y WYBORN, C.H. 1984. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. J. Invertebr. Pathol. 44:128-133.
- WEST, A.W. 1984. Fate of the insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. Soil Biol. Biochem. 16(4):357-360.
- WHITELEY, H.R. Y SCHNEPF, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 40:549-576.

- WHO. 1995. Application of the Principles of Substantial Equivalence to the Safety Evaluation of Foods or Food Components from Plants Derived by Modern Biotechnology. World Health Organization, Food Safety Unit, Geneva, Switzerland.
- WOLFERSBERGER, M.G., HOFMANN, C. Y LÜTHY, P. 1986. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin with Membrane vesicles isolated from Lepidopteran larval Midgut. In Bacterial Protein Toxins. Falmagne, P., Fehrenbech, F.J., Jeljaszewics, J. and Thelestam, M., Eds., New York, NY, pp 237-238.
- WRAIGHT, C.L., ZANGERL, A.R., CARROLL, M.J. Y BERENBAUM, M.R. 2000. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. Proc. Nat. Acad. Sci. 97(14): 7700-7703.
- WRIGHT, K.N. 1988. Nutritional properties and feeding value of corn and its by-products. In Corn: Chemistry and Technology, Watson S.A. and Ramstad, P.E., Eds., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, pp 447-478.
- YAMAMOTO, T. Y POWELL, G.K. 1993. Structure and function of the insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. In Recent Adv. Mol. Biochem. Res. Proteins, Proc. IUBMB Symp. Protein Struct. Funct., Meeting date 1992, World Sci., Singapore, Singapore, pp 137-44.
- YU, L., BERRY, R.E. Y CROFT, B.A. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae). Ecotoxicology 90(1):113-118.



Monsanto Agricultura España, S.L.
Avda. de Burgos, 17 - 10ª plta.
28036 Madrid
Tel. 91 343 27 01 - Fax 91 343 27 27
www.monsanto.es