

Cuaderno Técnico nº 2

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



EDICIÓN
10º ANIVERSARIO

INDICE

Resumen.....	3
Introducción	5
Caracterización molecular del maíz MON 810.....	9
Niveles de proteína CryIAb en las plantas de maíz MON 810	10
Seguridad de la proteína CryIAB.....	11
- <i>Modo de acción de CryIAb y especificidad</i>	12
- <i>Digestión de la proteína CryIAb en fluidos gástricos e intestinales simulados</i>	13
- <i>Ausencia de toxicidad oral aguda en ratón.</i>	13
- <i>Falta de similitud de secuencia de la proteína CryIAb con proteínas tóxicas conocidas</i>	14
- <i>Falta de homología de la proteína CryIAb con alérgenos conocidos.</i>	14
Evaluación de la composición y valor nutritivo del maíz YieldGard	16
Calidad del grano	24
Impacto del cultivo de variedades YieldGard sobre el medio ambiente.....	26
- <i>Evaluaciones previas sobre la seguridad de la proteína CryIAb y el maíz MON 810</i>	26
- <i>Manejo de la resistencia en las poblaciones de taladros</i>	31
- <i>Planes de seguimiento de maíz YieldGard</i>	32
- <i>Resultados de los Planes de Seguimiento</i>	35
- <i>Publicaciones científicas independientes</i>	37
Beneficios.....	40
Conclusiones	41
Bibliografía	43

RESUMEN

Utilizando modernas técnicas de biotecnología, Monsanto desarrolló entre 1990 y 1996 la línea de maíz MON 810, a partir de la cual se han derivado las variedades de maíz YieldGard® protegidas contra taladros. Las variedades YieldGard producen la proteína natural CryIAb, de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que las protege específicamente de los daños causados por las larvas de ciertas especies de lepidópteros, entre las que se encuentran *Ostrinia nubilalis* y las especies de *Sesamia*, conocidas comúnmente como taladros del maíz.

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 medio siglo, 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 muestran que los niveles de los nutrientes principales 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 conven-

cionales, 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 la presencia de fumomisininas (micotoxinas).

Después de una completa y detallada revisión de los estudios realizados con el maíz MON 810, las autoridades regulatorias americanas y europeas autorizaron su empleo comercial en 1996 y 1998, respectivamente.

Las evaluaciones para comprobar su seguridad medioambiental mostraron que el maíz YieldGard carece de efectos relevantes 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 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.

El cultivo comercial de las variedades YieldGard, derivadas de MON810, está siendo acompañado por un seguimiento sin parangón desde las empresas comercializadoras y la comunidad científica, cuyos resultados, hasta la fecha, son consistentes con las evaluaciones de seguridad previas a la autorización. Así, tras una década de cultivo comercial, las conclusiones de los estudios y seguimiento realizado confirman las ventajas y beneficios de esta protección frente a otras alternativas de control, y ratifican que las variedades de maíz YieldGard son tan seguras y equivalentes nutricionalmente a sus correspondientes 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 desarrolló 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 Cry1Ab, 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 las orugas de *O. nubilialis* y las especies de *Sesamia*. En EEUU y otras zonas maiceras, esta protección también se extiende a *Diatraea grandiosella*, otra especie plaga de importancia agronómica.

Tanto *O. nubilialis* como las especies de *Sesamia* son plagas de importancia agronómica en nuestro país (Castañera, 1996) 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 que sus larvas se desarrollan en el interior de las cañas de maíz, lo que ha determinado que la mayoría de los métodos de protección alternativos (insecticidas) ofrezcan sólo una protección limitada. La alimentación de las orugas



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

de taladro sobre la médula de las cañas disminuye la capacidad de producción de las plantas y las hace muy sensibles al derribo por lluvia o viento, con pérdidas de cosecha que se agravan si el ataque se produce en los primeros estados de desarrollo del maíz y con deterioro de cosecha en ataques a mazorcas.

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. nubilialis* 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. Las estimaciones de incremento medio de cosecha por empleo de variedades protegidas contra taladros oscilan en torno al 6-7% (Brookes, 2002; Serra y otros, 2006), con incrementos superiores al 11%, cuando los ataques de taladro son más importantes (Novillo y otros, 2003).

La obtención de variedades protegidas frente a taladros ya constituía una de las líneas de mejora clásica, por sus considerables ventajas frente a otras alternativas de protección. Así, 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; Serra y otros, 2006) 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 *cryIA* (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. El cultivo comercial se inició en EEUU con 4 millones de ha sembradas en 1997, que casi se triplicaron durante los dos años siguientes (Betz y otros, 2000).

La solicitud para importación y cultivo del maíz MON 810 fue presentada en la UE, en 1995, bajo la Directiva 90/220/EEC, a través de Francia, como Estado Miembro Ponente. Tras recibir la opinión favorable del Comité Científico de Plantas, el 10 de febrero de 1998, concluyendo que *“no existía evidencia de que las semillas de este tipo de maíz, resistente a insectos por expresión del gen cryIA, fuera a causar efectos adversos sobre la salud humana o animal, ni sobre el medio ambiente, cuando se cultivara, importara y procesara de la forma indicada”* (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out02_en.html), la modificación genética MON 810 alcanzó la mayoría cualificada en el Comité Regulatorio de la Comisión Europea, compuesto por expertos de los estados miembros. (Decisión de la Comisión de 22 de abril de 1998 – 98/294/EC)¹.

En paralelo, se aportó la información necesaria para demostrar la equivalencia composicional y seguridad del maíz con MON 810 comparado con el maíz convencional al Comité Asesor sobre Nuevos Alimentos y Procesos del Reino Unido (ACNFP), que en febrero de 1997 informó que *“los productos procesados, obtenidos a partir del maíz MON 810 y su líneas derivadas por técnicas de mejora convencional eran sustancialmente equivalentes, tan seguras para su empleo en alimentación y sin diferencias en composición respecto al maíz obtenido por técnicas de mejora convencionales”*. Tras recibir este informe favorable, Monsanto notificó a la Comisión la puesta en el mercado de alimentos y fracciones alimentarias derivadas de la progenie de las líneas de maíz MON 810, en diciembre de 1997 (98/C 200/08)².

®Dipel es una marca registrada de Abbott Laboratories

¹ http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/1998/l_131/l_13119980505en00320033.pdf

² http://europa.eu.int/eurlex/pri/en/oj/dat/1998/c_200/c_20019980626en00160016.pdf

Posteriormente, y de acuerdo con el nuevo Reglamento Comunitario 1829/2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, los productos derivados del maíz, incluyendo fracciones para piensos, aditivos para alimentos y piensos han sido incluidos en el registro comunitario, en abril de 2005 (http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm).

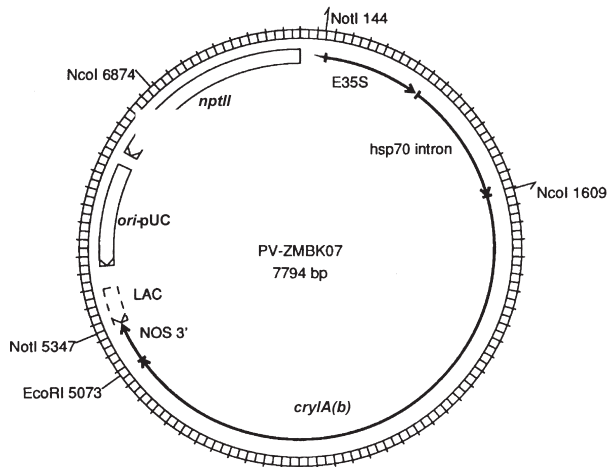
Las evaluaciones sobre la seguridad de estas variedades para el medio ambiente, para su consumo, o utilización en fabricación de piensos, han sido un paso previo necesario para obtener las aprobaciones en los principales países productores o importadores de maíz, donde se encuentra autorizado. Estas evaluaciones incluyen: una detallada 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). A los estudios realizados por Monsanto hay que añadir artículos revisados y publicados en revistas científicas, que apoyaron la conclusión del mínimo riesgo de las variedades de maíz YieldGard (Pilcher y otros, 1997; Aulrich y otros, 1998; Daenicke y otros, 1999).

En los siguientes párrafos se resumen las conclusiones más relevantes de las evaluaciones sobre la seguridad del maíz MON 810, revisadas por las autoridades regulatorias antes de autorizar su cultivo comercial o consumo. Posteriormente, y durante la década de comercialización, se ha realizado un completo seguimiento que ha generado más información sobre la seguridad de la proteína CryIAb y la modificación genética MON 810 para el hombre y el medio ambiente. Así, en esta nueva edición se añaden las citas y conclusiones de nuevos trabajos y estudios publicados, que muy probablemente seguirán creciendo durante los próximos años.

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) (Frale 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 *np11* 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 1). 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 esencial para 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 (Novillo y otros, 2003; Serra y otros, 2006).

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 comienzo de indentación (early dent). 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, justifi-

cándose 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; Escriche y Ferré, 2001). 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 testigo 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 dife-

rencias estadísticas en la mortalidad, peso, ganancia de peso o consumo de alimento, entre el grupo testigo 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 alérgico de una proteína, el factor más importante es si la fuente del gen introducido en la planta es alérgica (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 alergenidad 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 físico-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 alérgico (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 fue que no se encontraron secuencias de significado inmunológico, u homologías alérgicas, 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 alérgica y la proteína CryIAb, carece de similitud en secuencias de importancia inmunológica con alérgenos conocidos, y en las características de dichas proteínas. Estos estudios apoyan la seguridad de la proteína CryIAb y son completamente consistentes con la extensa historia de uso

seguro de la proteína CryIAb, la cual 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).

Las evaluaciones con la proteína CryIAb se han completado con un estudio realizado por científicos portugueses, empleando extractos de proteínas de maíz MON 810 y otras modificaciones genéticas. Tras comparar las reacciones en dos grupos de personas sensibles, ninguno de los 57 voluntarios mostró evidencia de alergias dérmicas y sus reacciones a las muestras de maíz y soja transgénico, o convencional, fueron similares. Tampoco se detectaron anticuerpos IgE como consecuencia de la exposición a las nuevas proteínas (Batista y otros, 2005).

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 testigo, 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 testigo 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 testigo. 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	MON	MON	MON	
	810	818 ^e	810	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 ^j (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 testigo 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 testigo 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 testigo 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 testigo 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 testigo. 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 testigo 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 testigo. 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 testigo. 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 testigo en los ensayos realizados en 1994 en EEUU, pero significativamente inferiores que en la línea testigo 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 testigo 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 testigo 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 testigo. 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
	Media ^b (Intervalo) ^c		Media ^d (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 testigo en el ensayo.

^g Watson, 1982.

^h Diferencias estadísticas respecto a la línea testigo 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 testigo, 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 testigo 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 testigo.

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 testigo 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 testigo. Se observó un incremento estadísticamente significativo en el nivel de proteína del forraje de MON 810 comparado con la línea de testigo. 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 protegidos contra taladro por expresión de la proteína CryIAb, 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 con maíz Bt o con maíz convencional recogido en verde y picado (Faust y Miller, 1997); asimismo, la digestibilidad en ganado

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 testigo es MON 820

^d Intervalo para las líneas testigo, 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 testigo en el intervalo de confianza del 95%.

vacuno alimentado sobre ensilado a partir de maíz Bt, o convencional, era similar (Daenicke y otros, 1999); y en un estudio 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 convencionales 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 de acuerdo con el Artículo 5 del Reglamento CE 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios (ver página 7).

CALIDAD DEL GRANO

La presencia de fumomisinias en harinas de maíz puede llegar a niveles que las inhabiliten para su consumo, como recuerdan en la UE las notificaciones del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información sobre Alimentos y Piensos (http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm)

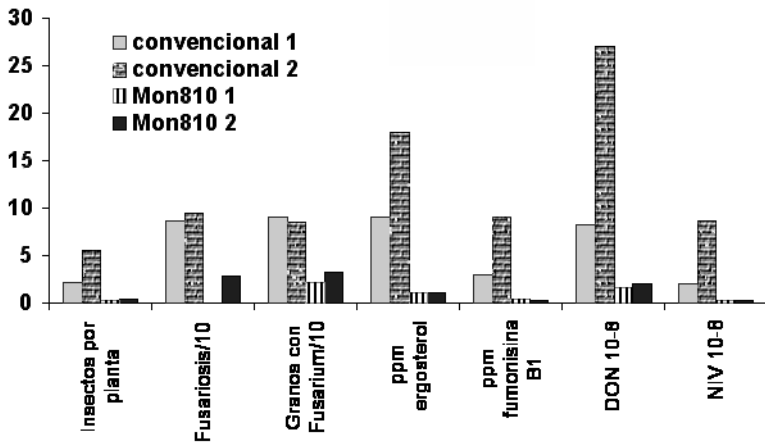
En condiciones de ataques de taladros a las mazorcas, el maíz YieldGard ha demostrado mejorar la calidad del grano, lo cual además contribuye a mejorar la seguridad del maíz para fabricación de piensos y alimentos. Los investigadores han confirmado que el maíz YieldGard reduce los daños por insectos 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).



Desarrollo de fusarium sobre granos dañados por taladros, en maíz convencional (Iso) frente a mazorcas sanas de maíz YieldGard (Bt).

Las investigaciones realizadas por la Universidad de Iowa y el Departamento de Agricultura de EEUU, entre 1995 y 1998, muestran que los híbridos de maíz YieldGard, que expresan la proteína CryIAb, reducen los niveles de podredumbres en mazorca y niveles de fumonisinas en el grano, hasta en un 93%, comparados con los híbridos convencionales (Munkwold y otros, 1997; Munkwold y otros, 1999; Masoero y otros, 1999). La menor contaminación por micotoxinas ha sido constatada también en estudios en diferentes países europeos (Cahagnier y Melcion, 2000; Pietri y Piva, 2000), con resultados en España que muestran una reducción en el contenido de fumonisinas superior al 80% (Cahagnier y Melcion, 2000; Serra y otros, 2006).

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



Una revisión reciente ha evaluado el impacto económico, y sobre la salud humana que conlleva la reducción de micotoxinas en el maíz protegido contra insectos. Teniendo en cuenta que los niveles máximos admitidos de fumomisininas y aflatoxinas en las partidas de grano para alimentación están siendo revisados, con límites más bajos que obligarían a destinar a parte de la producción de maíz a otros usos, se ha estimado que los beneficios económicos del maíz Bt protegido contra insectos se elevan a 23 millones de dólares anuales sólo en EEUU (Wu, 2006).

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 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 (Sedlacek y otros, 1999).

IMPACTO DEL CULTIVO DE VARIEDADES YieldGard SOBRE EL MEDIO AMBIENTE.

Evaluaciones previas sobre la seguridad de la proteína CryIAb y el maíz MON 810

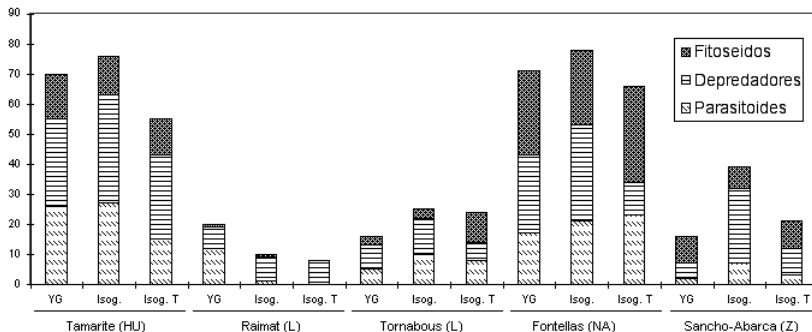
Existe una extensa información sobre la carencia de efectos de las preparaciones microbianas de cepas de *B.t.k.*, que contienen la proteína CryIAb (Melin y Cozzi, 1990). La secuencia completa de la proteína CryIAb, codificada por el gen *cryIAb*, empleado en las variedades YieldGard, y la forma activa, 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 medio siglo. 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, 1988a y 1988b; Van Rie y otros, 1989 y 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, con carácter previo a su comercialización se evaluó su efecto potencial sobre un grupo representativo de organismos no diana. 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; el himenóptero parásito de la mosca doméstica *Brachymeria intermedia*; el coccinélido *Hippodamia convergens*, insecto auxiliar depredador; y la 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 de los testigos.

Además de los citados estudios, existen citas bibliográficas que recogen la falta de efectos negativos 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 (Yu 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 testigo (Orr y Landis, 1997).

El seguimiento de las poblaciones de insectos auxiliares en los ensayos y parcelas demostrativas durante 1998 y 1999 en España, mostró 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 (Novillo y otros, 2003; 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 YieldGard y sus respectivas líneas isogénicas, durante 1998.

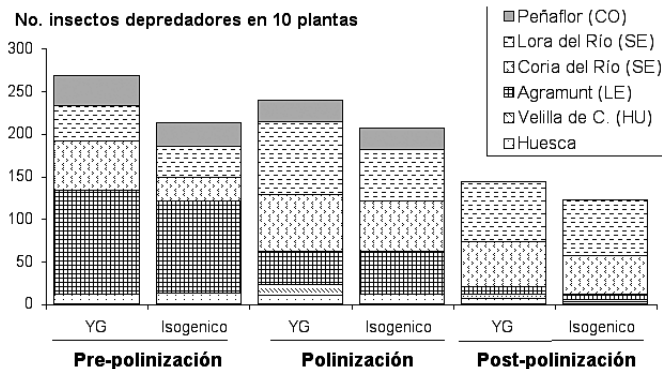


Número medio de insectos depredadores y parasitoides recogidos en aspiraciones de dos minutos (2-4/9/98) en los líneas centrales de las parcelas sembradas con una variedad YieldGard (YG), su variedad isogénica (Isog) y ésta última protegida contra taladros mediante aplicación de insecticidas (Isog T).

Número medio de ácaros fitoseidos 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% (0.5l/ha), en el estado de maíz 8-10 hojas.

Fig 3. Número medio de insectos depredadores beneficiosos en variedades de maíz YieldGard y sus respectivas líneas isogénicas, durante 1999.



Los valores representan el número medio en 10 plantas, en cada parcela y localidad, antes de la polinización, durante plena polinización y tras ésta. N=4

En condiciones de laboratorio, se comprobó que las larvas de mariposa monarca, *Danaus plexippus*, son susceptibles a la proteína CryIAb (Losey y otros, 1999), atrayendo la atención de los medios sobre el posible impacto del cultivo de maíz Bt, en las áreas donde está presente esta vistosa mariposa. Para verificar los posibles efectos y realizar una evaluación de riesgo rigurosa y específica de cada modificación genética, se han llevado a cabo numerosos trabajos de investigación en condiciones de campo, presentados en diferentes Symposia sobre la mariposa monarca y/o publicados en revistas científicas. Los resultados más destacados de estos trabajos son que: 1) el polen de maíz es bastante pesado y la mayor parte se deposita en los propios campos de maíz, 2) la exposición de la mariposa monarca y de otras especies como *Papilio polyxenes*, al polen de maíz en condiciones de campo es muy baja, pues no siempre coincide su presencia con el momento de la polinización; 3) la densidad de *Asclepias syriaca* (lechetrezná), su planta hospedante, es mucho mayor en las cunetas y baldíos que en los campos de maíz, donde se emplean herbicidas; y 4) las mariposas prefieren depositar sus huevos en lechetreznas que se encuentran fuera de los campos (Wraight y otros, 2000; Hellmich y otros, 2001; Pleasants y otros 2001; Oberhauser y otros, 2001; Stanley-Horn y otros, 2001; Sears y otros, 2001).

Los trabajos específicos con el polen de variedades de maíz YieldGard han demostrado que éste no tiene efecto sobre el peso de las larvas de mariposa Monarca o su supervivencia, a densidades superiores a las que frecuentemente se encuentran en lechetreznas de campos de maíz (Helmich y otros 2001; Stanley-Horn y otros 2001) y su cultivo representa un bajo riesgo, pues tanto la toxicidad como la exposición en condiciones de campo son bajas. (Sears y otros, 2001).

Frente a las alarmas infundadas sobre el impacto del cultivo de maíz Bt en las poblaciones de monarca, es un hecho constatado que la mayor amenaza para esta especie es la destrucción de su hábitat. Por otra parte, el cultivo de maíz Bt ha mostrado ser una alternativa más favorable que el empleo de maíz convencional con aplicación de insecticidas no selectivos, para protegerlo de los daños de taladro (Stanley-Horn y otros, 2001).

Para confirmar la esperable rápida degradación de la proteína CryIAb en el suelo, se ha estudiado su degradación en restos de las plantas de maíz que quedaron tras la cosecha, incorporados al suelo mediante labo-

res o 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 determinación 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 TD_{50} (tiempo en el que la bioactividad se reduce al 50%) y TD_{90} (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.

Las conclusiones de las evaluaciones descritas en los párrafos anteriores muestran que el maíz YieldGard carece de efectos perjudiciales sobre insectos auxiliares y beneficiosos desde el punto de vista agronómico, incluyendo abejas, coccinélidos, crisopas, 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 y los colémbolos.

Manejo de la resistencia en las poblaciones de taladros

Los entomólogos han observado que las poblaciones de insectos se adaptan a los insecticidas si éstos 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 controle 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.

Cuando se cumple el 10º aniversario del cultivo comercial de variedades con MON 810, y tras un crecimiento continuo de las superficies con maíz Bt, hasta los 17,8 millones de hectáreas en 2005 (James, C. 2005), el seguimiento de la resistencia ha concluido con resultados que descartan un incremento de la misma en condiciones de campo.

Planes de Seguimiento de maíz YieldGard

La Directiva 2001/18/CE y el Reglamento CE/1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, que regulan las liberaciones voluntarias y comercialización de organismos modificados genéticamente en la UE, siguen un proceso de evaluación “caso por caso”. Las autorizaciones tienen una duración limitada a 10 años y obligan a los solicitantes a un Plan de Seguimiento para cada modificación genética, con el fin de conocer los efectos directos o indirectos, inmediatos o diferidos, de la misma.

Los objetivos del Plan de Seguimiento son los de confirmar que cualquiera de las presunciones realizadas sobre la aparición de posibles efectos adversos del OMG o de su empleo en la evaluación de riesgo para el medio ambiente (e.r.m.a.) son correctas, e identificar la aparición de éstos, en caso de que no hubieran sido previstos en la e.r.m.a. El Plan de Seguimiento europeo contempla así dos tipos de situaciones: seguimiento específico (“case specific monitoring”), para factores de riesgo identificados como probables en la e.r.m.a. previa a la aprobación, y general (“general surveillance”), cuyo objetivo es identificar la aparición de efectos adversos no previstos en el proceso de evaluación de riesgos. En este caso se ha determinado que para la detección temprana de efectos imprevistos se establezcan redes de observación rutinarias en diversos ambientes.

De acuerdo con la autorización de comercialización de MON 810 en la UE, su cultivo está siendo acompañado de un riguroso plan de Manejo de la Resistencia de los Insectos diana (IRM) articulado en torno a tres elementos: empleo de refugios, seguimiento de la resistencia en las poblaciones de taladros y programas informativos y educativos con los agricultores. Adicionalmente y aunque este evento fue autorizado en la UE de acuerdo con la antigua Directiva 90/220/CEE, Monsanto ha iniciado voluntariamente un seguimiento general (general surveillance). Este seguimiento está basado tanto en encuestas a agricultores, con un diseño y análisis estadístico para detectar observaciones inusuales en las zonas donde se ha cultivado variedades con MON 810, y en revisiones periódicas de las publicaciones científicas y estudios independientes, que estén relacionados con la seguridad para el medio ambiente.

En España, además, se ha desarrollado una regulación específica sobre seguimiento de las variedades que incluyan modificaciones genéticas, que se

añade a la europea (Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, de 23 de marzo de 1998, por la que se modifica el Reglamento general del registro de variedades comerciales, posteriormente actualizado por el Real Decreto 323/2000).

En el caso de variedades con MON 810, las diferentes autorizaciones que han ido progresivamente incluyendo éstas en el Registro Español de Variedades (Ordenes APA/520/2003, APA/314/2004, APA/2628/2005 y APA/2749/2006) hasta completar el listado que se recoge en la Tabla 7, está establecida la obligación de llevar a cabo un Plan de Seguimiento vertebrado en los siguientes apartados:

- 1) La propuesta para el Plan de Seguimiento debe ser presentada a las autoridades en el periodo de dos meses, tras la aprobación de cada variedad y debe abarcar un periodo de al menos 5 años.
- 2) Cada año, se debe suministrar a las autoridades nacionales y regionales los datos de ventas y listado de compradores.
- 3) Se debe realizar un seguimiento que contenga al menos los siguientes aspectos:
 - Evaluación de la efectividad del carácter insecticida de la modificación MON 810;
 - Estudio de la posible aparición de resistencias a la proteína CryIA(b) en las poblaciones de taladro;
 - Posibles efectos sobre la entomofauna y microorganismos del suelo, en las parcelas cultivadas con estas variedades.
 - Indicación de la superficie que deberá sembrarse con variedades convencionales en relación con la superficie sembrada con variedades modificadas genéticamente, con el fin de que le sirvan de refugio al taladro;
 - Programas de información a los agricultores, recomendando prácticas culturales para el control de plantas adventicias, así como la necesidad de la siembra de una banda con una variedad convencional de maíz con la anchura y características adecuadas en cada caso.
- 4) En aquellos casos en los que se hubiera detectado la aparición de insectos resistentes, se informará al Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente, Comisión Nacional de Biovigilancia, Comunidad Autónoma correspondientes y a los representantes de los sectores implicados.

Si se confirma la resistencia, y se estima que los efectos detectados presentan especial relevancia, además de notificar el hecho a los agentes anteriormente

citados, se debe asesorar a los agricultores sobre la aplicación de las medidas necesarias para paliar los efectos adversos detectados, proceder a la destrucción de los restos de cosechas por los medios más aconsejables y si estas medidas no surtieran efecto, cesaría la venta de cualquier variedad de maíz que contenga dicho producto en la localidad afectada y en las circundantes.

Tabla 7. Variedades de maíz derivadas de MON 810 (MON-ØØ81Ø-6), autorizadas para su comercialización en España¹

Empresa Comercializadora	Variedad (fecha de autorización en BOE o en el Catálogo Europeo)
Pioneer Hi-Bred	PR33P67 (11/03/03), PR32P76 (16/02/04), BACILA (11/08/05), PR32R43 (11/08/05), PR32VV04 (11/08/05), PR34N44 (11/08/05), PR36R11 (11/08/05), PR31 N28 (7/09/06), PR33 B51 (7/09/06), ELGINA (17/09/04), OLIMPICA (17/09/04), BOLSA (17/09/04), LEVINA (17/09/04), PR38F71 (21/04/06), PR39V17 (21/04/06)
Monsanto Agricultura	DKC 6575 (11/03/03), DKC 6550 (16/02/04), DKC4442YG (11/08/05), DKC5784YG (11/08/05), DKC6041YG (11/08/05), DKC5018YG (7/09/06), DKC513 (17/09/04), DKC3421YG (21/04/06)
Limagrain Ibérica	ALIACAN BT (11/03/03), ARISTIS BT (11/03/03), GAMBIER BT (16/02/04), CAMPERO BT (16/02/04), HELEN BT (11/08/05), BELES SUR (7/09/06), LUSON BT (7/09/06), VIRIATO BT (7/09/06), ASTURIAL BT (7/09/06)
Semillas Fitó	JARAL BT (16/02/04), SF1035T (11/08/05), SF1036T (11/08/05), SF112T (11/08/05), AZEMA YG (7/09/06)
Arlesa	CUARTAL BT (16/02/04), RIGLOS BT (11/08/05)
Corn States International	EVOLIA YG (7/09/06)
Koipesol	PROTECT (16/02/04)
Coop de Pau	NOVELIS (17/09/04)
Agrar Semillas (Maisadour)	FOGGIA (11/08/05)

¹ Listado actualizado hasta septiembre de 2006.

Resultados de los Planes de Seguimiento

El seguimiento de la resistencia se inició con carácter previo o durante el primer año de cultivo comercial de maíz Bt, con el establecimiento de las líneas base de susceptibilidad para las poblaciones de taladro en España (González-Núñez y otros, 2000) y en el resto de países. Periódicamente, se han vuelto a recoger poblaciones de taladros en aquellas zonas donde se cultiva este tipo de variedades, y se ha comprobado si existían variaciones en su susceptibilidad a la proteína CryIAb, mediante estimación de las concentraciones letales para el 50% y 90% (CL_{50} y CL_{90}). Los resultados obtenidos tras el cultivo comercial del evento Bt176, cultivado en España desde 1998 y con datos publicados hasta 2002 (Farinós y otros 2004), así como los obtenidos tras la autorización de variedades con el evento MON 810, en 2003, muestran resultados sin cambios significativos en la susceptibilidad de las poblaciones de *O. nubilalis* y *Sesamia nonagriodes*.

Otra comprobación de la eficacia insecticida de estas variedades son la ausencia de reclamaciones y el alto grado de satisfacción de los agricultores en las encuestas de opinión, realizadas entre usuarios de las zonas donde se registran los mayores ataques de taladros.

Las compañías comercializadoras de variedades de maíz YieldGard en España han realizado desde 2003 un notable esfuerzo para informar a los agricultores sobre la obligación de sembrar refugios y el manejo de los mismos. Para ello se han editado materiales en diferentes formatos (folletos, DVD, charlas informativas, visitas de campo, etc) y Guías de Buenas Prácticas que se incluyen en los sacos de semillas (Figura 4), asegurando que el agricultor conoce el manejo apropiado de estas variedades.

Figura 4. Ediciones de la Guía Apose sobre Buenas Prácticas con el maíz Bt, incluidas en los sacos de semillas de variedades de maíz YieldGard.



Respecto a la evaluación de los posibles efectos sobre entomofauna, tras diferentes estudios en condiciones de campo en España, con los primeros resultados revisados y publicados en revistas científicas (de la Poza y otros 2005; Eizaguirre y otros, 2006), no se ha observado hasta la fecha un efecto directo o indirecto significativo y consistente por cultivo de variedades protegidas con la proteína CryIAb. Tampoco se han observado diferencias significativas en evaluaciones específicas sobre ácaros depredadores fitoseidos con variedades YieldGard. Las evaluaciones de los aspectos funcionales del suelo para valorar el posible efecto de cultivo de variedades YieldGard sobre los microorganismos del suelo han concluido que las condiciones climáticas de cada año, el tipo de suelo, su manejo agrario y otras variaciones macroscópicas tienen un mayor impacto sobre los procesos biológicos que el hecho de sembrar una variedad convencional o con la modificación genética MON 810.

Los resultados publicados por el Departamento de Medio Ambiente de Baviera, en Alemania, donde se han evaluado entre otros la abundancia de diferentes depredadores, parasitoides y arañas, en variedades YieldGard y sus

respectivas variedades isogénicas, son consistentes con los resultados obtenidos en España, con diferencias en general mayores cuando se comparan los resultados entre años o tras aplicar un insecticida, que cuando se cultiva una variedad YieldGard (http://www.lfl.bayern.de/publikationen/datenerfassung/schriftenreihe_url_1_28.pdf)

Por último, las encuestas realizadas a agricultores, para seguimiento general en España, República Checa, Francia, Portugal y Alemania, países donde ha existido un cultivo comercial de variedades YieldGard, no sugieren ningún efecto adverso achacable al empleo de estas variedades.

Publicaciones científicas independientes

Una parte importante del seguimiento lo constituyen los estudios publicados en revistas científicas, tras revisión anónima por expertos independientes (Peer review).

De acuerdo con los estudios realizados en España, la experiencia durante los primeros 8 años de cultivo con maíces Bt es muy positiva, sin evidencia de aparición de resistencia en insectos (Farinós y otros, 2004), ni efectos adversos sobre organismos no objetivo (De la Poza y otros, 2005), y con unos beneficios cifrados en 15,5 millones de euros, durante los primeros 6 años (Demont y Tollens, 2004). En zonas de ataque de taladros, los agricultores que cultivan maíz Bt superan en rendimiento a los que cultivan maíz convencional y aplican menos tratamientos insecticidas en el cultivo (Gómez-Barbero y otros, 2006).

Una revisión más amplia, abarcando diferentes geografías, muestra un vasto listado de trabajos sobre la seguridad para organismos no objetivo, con la proteína CryIAb o con el evento MON810 (Tabla 8), y que con toda probabilidad seguirá creciendo. Los resultados destacables son que las diferencias observadas no son significativas, o son menos importantes que las debidas a otras condiciones ambientales (Baumgarte y Tebbe, 2005). Por otra parte, los efectos sobre enemigos naturales como las especies de *Crysopa*, inicialmente atribuidos a la proteína CryIAb, han sido descartados tras comprobar que eran debidos a la calidad de las presas empleadas (Dutton y otros, 2002; Romeis y otros, 2004) y confirmar la falta de receptores específicos para esta toxina en dicha especie (Rodrigo-Simón y otros, 2006).

Tabla 8. Estudios publicados sobre efectos de variedades de maíz con la proteína CryIAb para organismos no objetivo

Organismos	Orden, familia o género	Referencias
Lombrices	<i>Lumbricus</i> <i>Aporrectodea</i>	1; 2; 3 4
Nematodos	Nematodos	3; 5; 6
Babosas	<i>Derocheras</i>	7
Arañas	<i>Oedothorax</i> , <i>Erigone</i> y otras 11 especies <i>Araneus</i> y otras 29 especies (14 familias) de Araneae	8; 9; 10; 11 12; 13; 14; 15; 16
Opiliones	Opiliones	15
Ácaros	<i>Tetranychus</i> y ácaros sin clasificar <i>Trombidiidae</i> y <i>Acarus siro</i> <i>Neoseiulus</i> y otros depredadores de ácaros	17; 8; 18 15; 19 18; 20
Milpíes	Myriapoda	15
Tijeretas	Dermaptera	15; 10
Saltamontes	<i>Zygnidia</i> y otros Orthoptera	21; 14
Grillos	<i>Gryllus</i> y <i>Allenemobius</i>	14
Thrips	<i>Franklinella</i> , Thripidae y otros	22, 14; 11; 10
Heterópteros	Anthocoridae (<i>Orius</i>) <i>Geocoris</i> Nabidae Miridae Chinches <i>Blissus</i> y otras	23; 24; 8; 25; 15; 22; 14; 26; 10 14 15; 22, 14 22 14
Homópteros	<i>Metopodium</i> , <i>Sitobium</i> y otros pulgones, <i>Rhopalosiphum</i> y <i>Metopolophium</i> (pulgones del maíz) Cicadellidae, Delphacidae, <i>Z. scutellaris</i>	12; 17; 24; 21; 10; 27; 24; 22; 11; 28 12; 22; 10
Neurópteros	<i>Chrysoperla</i>	24; 8; 29; 15; 22; 26; 30
Coleópteros	Coccinellidae (<i>Hippodamia</i> , <i>Coccinella</i> , <i>Coleomegilla</i> , <i>Cycloneda</i>) Cincindellidae <i>Megacephala</i> Anthicidae Crisomelidae Staphylinidae Elateridae, <i>Agriotes</i> Carabidae, <i>Scarites</i> , <i>Harcalus</i> <i>pennsylvanicus</i> y otras 36 especies Lampyridae Phalacridae <i>Chaetocnema pulicaria</i> (escarabajo mosca) Fungívoros (Corylophidae, Phalacridae) Adultos de <i>Diabrotica</i>	12; 24; 8; 15; 22; 14; 26; 31; 10 14 14 12; 22 12; 8; 15; 22; 14; 11 21; 22 12; 8; 32; 15; 22; 14; 33; 34; 35; 11 22 22 14 22 14

Tabla 8. Estudios publicados sobre efectos de variedades de maíz con la proteína *CryIAb* para organismos no objetivo (Continuación)

Organismos	Orden, familia o género	Referencias
Dípteros	Cecidomyiidae	15; 22
	<i>Syrphus corollae</i> y otros Syrphidae	8; 24; 36; 15
	Dípteros saprovoros	20
Lepidópteros	<i>Danaus</i> (mariposa monarca)	37; 38; 39; 40; 41
	<i>Papilio</i> , gusanos de seda (<i>Antheraea</i>) y <i>Agrotis</i>	42; 43; 44; 21
	<i>Plutella</i> , <i>Pieris</i> y otras mariposas no objetivo	45
Himenópteros	Ceraphronidae y otros himenópteros parasitoides	24; 8; 36; 22; 31; 10
	Braconidae <i>Macrocentrus</i> y <i>Cotesia</i>	26; 46
	Hormigas <i>Solenopsis</i>	14
Colémbolos	Collembola	10; 6
Microorganismos	Hongos, protozoos, amebas, bacterias	1; 3; 5; 47
	Bacterias de la rizosfera	47; 48

Referencias

- | | | | |
|----|--------------------------|----|-----------------------------|
| 1 | Saxena y Stotzy, 2001 | 25 | Pons y otros, 2004 |
| 2 | Zwahlen y otros, 2003 | 26 | Pilcher y otros, 2005 |
| 3 | Stotzy, 2004 | 27 | Head y otros, 2001 |
| 4 | Vercesi y otros, 2006 | 28 | Lumbierres y otros, 2004 |
| 5 | Griffiths y otros, 2005 | 29 | Romeis y otros, 2004 |
| 6 | Griffiths y otros, 2006 | 30 | Rodrigo-Simón y otros, 2006 |
| 7 | Harwood y Obrycki, 2006 | 31 | Reyes, 2005 |
| 8 | Jasinski y otros, 2003 | 32 | Mullin y otros, 2005 |
| 9 | Volkmar y Freier, 2003 | 33 | López y otros, 2005 |
| 10 | Eckert y otros, 2006 | 34 | Meissle y otros, 2005 |
| 11 | Habustova y otros, 2006 | 35 | Harwood y otros, 2006 |
| 12 | Lozzia, 1999 | 36 | Candolfi y otros, 2004 |
| 13 | Meissle y Lang, 2005 | 37 | Losey y otros, 1999 |
| 14 | Daly y Buntin, 2005 | 38 | Stanley-Horn y otros, 2001 |
| 15 | De la Poza y otros, 2005 | 39 | Sears y otros, 2001 |
| 16 | Ludy y Lang, 2006 | 40 | Anderson y otros, 2005 |
| 17 | Dutton y otros, 2002 | 41 | Oberhauser y otros, 2001 |
| 18 | Obrist y otros, 2006 | 42 | Wraight y otros, 2000 |
| 19 | Dabrowski y otros, 2006 | 43 | Zangeri y otros, 2001 |
| 20 | Dively, 2006 | 44 | Li y otros, 2005 |
| 21 | Pons y otros, 2005 | 45 | Gathmann y otros, 2006 |
| 22 | Dively, 2005 | 46 | Vojtech y otros, 2005 |
| 23 | Al-Deeb y otros, 2001 | 47 | Baumgarte y Tebbe, 2005 |
| 24 | Bourguet y otros, 2002 | 48 | Fang y otros, 2005 |

Junto a estos estudios, merece la pena destacar una reciente valoración por científicos expertos (Romeis y otros, 2006), donde después de revisar unos 50 estudios en campo y laboratorio, recomiendan aproximaciones paso a paso, de forma que la demostración de que una especie no es sensible a una proteína Bt, en laboratorio, pueda ser suficiente garantía de que el cultivo del OGM correspondiente será seguro para esta especie, mientras que si fuera sensible habría que confirmar en estudios de campo el grado real de exposición y efectos sobre la población de la misma. Otra conclusión relevante es que los estudios de campo y de laboratorio han confirmado que la abundancia y actividad de parasitoides y depredadores es similar en cultivos Bt y en cultivos convencionales, mientras que las aplicaciones de insecticidas autorizados a menudo tienen un impacto negativo sobre los organismos de control biológico. Por ello y por la reducción sustancial en el uso de insecticidas, las variedades Bt se consideran un medio útil para los sistemas de lucha integrada.

BENEFICIOS

Aunque el análisis y cuantificación de beneficios de las variedades YieldGard, derivadas de MON 810, no es el propósito de esta publicación, existen numerosas publicaciones disponibles que ilustran el valor económico y social aportado por el maíz Bt y las razones de su aceptación por los agricultores (Heimlich y otros, 2000; Brookes y Barfoot, 2005; Gómez-Barbero y Rodríguez-Cerezo, 2006)

En zonas de España con ataques endémicos de taladros, la disponibilidad de variedades de maíz genéticamente protegidas contra orugas contribuye a aumentos de producción (Novillo y otros, 2003; Serra y otros, 2006; Gómez-Barbero y otros, 2006) y mejora los beneficios del cultivo (Brookes, 2002), sin necesidad de aplicar insecticidas para esta plaga. La conservación de recursos ligada al menor uso de plaguicidas tiene un impacto favorable sobre el medio ambiente (Phipps y Park, 2002) y el aumento en la producción es positivo, pues reduce las necesidades de agua, suelo, fertilizantes y otros recursos necesarios para obtener cada Tm. de maíz.

Son también destacables los beneficios económicos y sobre la salud humana asociados a la reducción de micotoxinas (Hammond y otros, 2003;

Wu, 2006). Todo ello ofreciendo un control selectivo de las plagas de taladro y una alternativa más segura para organismos no diana que el empleo de otras opciones, basadas en insecticidas de amplio espectro (Romeis y otros, 2006).

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 durante los diez años de cultivo comercial, con millones de hectáreas cultivadas en todo el mundo.

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 la proteína CryIAb y las plantas de maíz YieldGard. 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.

Los resultados obtenidos durante los 10 años de cultivo comercial de variedades YieldGard, con más de 12 millones de hectáreas en 2006 sólo en EEUU, son consistentes con las evaluaciones previas que apoyaron su autorización, sin que los Planes de Seguimiento en curso hayan detectado efectos adversos sobre el medio ambiente o la salud humana. Los estudios científicos independientes publicados también respaldan esta seguridad impecable, sin constancia contrastada de efectos adversos, directos o indirectos, inmediatos o diferidos, achacables a la modificación genética.

BIBLIOGRAFÍA

- AL-DEEB M.A., WILDE G.E. Y HIGGINS R.A. 2001. No effect of *Bacillus thuringiensis* corn and *Bacillus thuringiensis* on the predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). Environmental Entomology 30: 625-629.
- ANDERSON P.L., HELLMICH R.L., PRASIFKA J.R. Y LEWIS, L.C. 2005. Effects of fitness and behaviour of monarch butterfly larvae exposed to a combination of CryIAb-expressing corn anthers and pollen. Environmental Entomology 34: 944-952.
- 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.
- BATISTA R., NUNES B., CARMO M., CARDOSO C., SÃO JOSE H., BUGALHO DE ALMEIDA A., MANIQUE A., BENTO E., RICARDO C.P.Y OLIVEIRA M. 2005. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. J.Allergy Clin. Immunol. 116: 403-410.
- BAUMGARTE S. y TEBBE C. 2005. Field studies on the environmental fate of the CryIAb Bt-toxin produced by transgenic maize –MON810– and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. Molecular Ecology 14: 2539-2551.
- 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.
- BOURGUET D., CHAFAUX J., MICOUD A., DELOS M., NAIBO B., BOMBARDE F., MARQUE G., EYCHENNE N. Y PAGLARI C. 2002. *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). Environ. Biosafety Res. 1: 49-60.
- BROOKES G. 2002. The farm level impact of using Bt maize in Spain, ICABR Conference paper 2003, Ravello, Italy. www.pgeconomics.co.uk.
- BROOKES G. y BARFOOT P. (2005). GM crops: The global economic and environmental impact—the first nine years 1996–2004. Agbioforum, 8: 187-196.
- CAHAGNIER, B. Y MELCION D., 2000. Mycotoxines de *Fusarium* dans les maïs-grains à la récolte: relation entre la présence d'insectes (pyrale, sesamie) et la teneur en mycotoxines. Proc. 6th Int. feed Production Conference, Piacenza: 237-249.
- CANDOLFI M.P., BROWN K, GRIMM C, REBER B, y SCHMIDL H. 2004. A faunistic approach to assess potential side-effects of genetically modified Bt-corn on non-target arthropods under field conditions. Biocontrol Science and Technology 14: 129-170.
- CANTWELL, G.E., LEHNERT, T., Y FOWLER, J. 1972. Are biological insecticides harmful to the honey bee? Am. Bee J. 112: 294-296.

- CASTAÑERA, P. 1986. Plagas del Maíz. IV Jornadas Técnicas sobre el Maíz. Lérida. Plagas: 1-24. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- DABROWSKI Z.T., CZAJKOWSKA B. y BOCINSKA B. 2006. first experiments on unintended effects of Bt maize feed on non-target organisms in Poland. *GMOs in Integrated Plant Production*, OILB wprs bulletin 29 (5): 39-48.
- 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.
- DALY T. y BUNTIN, G.D.2005.Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for lepidopteran control on nontarget arthropods. *Environmental Entomology* 34: 1292-1301.
- DE LA POZA M., PONS, X., FARINÓS, G.P., LÓPEZ, C., ORTEGO, F., EIZAGUIRRE, M., CASTAÑERA, P. y ALBAJES R. 2005. Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protection* 24: 677-684.
- 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.
- 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.
- DIVELY G. 2005. Impact of Transgenic VIP3A X CryIAb Lepidopteran-Resistant Field Corn on the Nontarget Arthropod Community. *Environmental Entomology* 34: 1267-1291.
- DIVELY, 2006. Impact of transgenic VIP3a x CryIAb lepidopetran-resitant field corn on the non-target arthropod community. *Environmental Entomology* 34 (5) 1267-1291.
- 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.
- DUTTON A., KLEIN H., ROMEIS J.Y BIGLER F. 2002. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology* 27: 441-447.
- ECKERT J., SCHUPHAN I., HOTHORN L.A.Y GATHMANN A. 2006 Arthropods on maize ears for detecting impacts of Bt maize on nontarget organisms. *Environmental Entomology* 35: 554-560.
- EIZAGUIRRE M.,ALBAJES R., LÓPEZ C., ERAS J., LUMBIERRES B.Y PONS X. 2006. Six years after the commercial introduction of Bt maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. *Transgenic Research* 15:1-12.
- 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.
- ESCRICHE B. Y FERRÉ J. 2001. Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. Ed. P. Caballero y J. Ferré. Phytoma España. Valencia. pp 87-108.
- FANG M., KREMER R.J., MTAVALI P.P.Y DAVIS G. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of non-transgenic and transgenic corn. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4132-4136.
- 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.

- FARINÓS G.P., DE LA POZA M., HERNÁNDEZ-CRESPO P., ORTEGO F.Y CASTAÑERA, P. 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110: 23-30.
- 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.
- FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Fed. Regist. (USA)* 57: 22984-23005.
- 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.
- GATHMANN A., WIROOKS L., HOTHORN L., BARTSCH D., Y SCHUPHAN I. 2006. Impact of Bt Maize Pollen (MON810) on Lepidopteran Larvae Living on Accompanying Weeds. *Molecular Ecology* 15: 2677-2685.
- 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.
- GÓMEZ-BARBERO M., BERBEL J Y RODRÍGUEZ-CEREZO E. 2006. Estudio empírico de la adopción y el rendimiento agronómico/económico del primer cultivo transgénico en la Unión Europea (Maíz Bt en España). Abstracts de Biospain/Biotec, 18-20 sep 2006. Madrid. pp 130.
- GÓMEZ-BARBERO M., Y RODRÍGUEZ-CEREZO E. 2006. The adoption of genetically modified insect-resistant Bt maize in Spain: an empirical approach. 10th ICABR International Conference on Agricultural Biotechnology: Facts, Analysis and Policies. Ravello (Italy), 29 June-2 July 2006.
- 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.
- GRIFFITHS B.S., CAUL S., THOMPSON J., BIRCH A.N.E., SCRIMGEOUR C., ANDERSEN M.N., CORTET J., MESSÉAN A., SAUSSE C., LACROIX B., Y KROGH P.H. 2005. A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIAb toxin. *Plant and Soil* 275: 135-146.
- GRIFFITHS B.S., CAUL S., THOMPSON J., BIRCH A.N.E., SCRIMGEOUR C., CORTET J., MESSÉAN A., FOGGO A. Y KROGH P.H., 2006. Soil biological changes under Bt and non-Bt maize, with and without insecticide. *Journal of Environmental Quality* 35: 734 – 741.
- HABUSTOVA O., TURANLI F., DOLEZAL P., RUZICKA V., SPITZER L. Y HUSSEIN M.H. 2006. Environmental impact of Bt maize – three years of experience. GMOs in Integrated Plant Production, OILB wprs bulletin 29 (5): 57-63.
- HARWOOD J.D. Y OBRYCKI J.J. 2006. The detection and decay of CryIAb Bt-endotoxins within non-target slugs *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Pulmonata), following consumption of transgenic corn. *BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY* 16: 77-88.

- HARWOOD J.D., SAMSON R.Y OBRZYCKI J.J. 2006. No evidence for the uptake of CryIAb Bt-endotoxins by the generalist predator *Scarites subterraneus* (Coleoptera: Carabidae), in laboratory and field experiments. Biocontrol Science and Technology 16: 377-388.
- HEAD G., BROWN C.R., GROTH M.E. Y DUAN J.J. 2001. CryIAb protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. Entomologia Experimentalis et Applicata 99: 37-47.
- HEIMLICH R. E., FERNANDEZ-CORNEJO J., MCBRIDE W., KLOTZ-INGRAM C., JANS S.Y BROOKS N. (2000). Genetically engineered crops: has adoption reduced pesticide use? Agricultural Outlook. August 2000: 13-17.
- 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>
- 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.
- JAMES, C. 2005. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005. ISAAA Briefs. N° 34.
- JASINSKI J.R., EISLEY J.B., YOUNG C.E., KOVACH J. Y WILLSON H. 2003. Select nontarget arthropod abundance in transgenic and nontransgenic field crops in Ohio. Environmental Entomology 32: 407-413.
- 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.
- LI W., WU K., WANG X., WANG G. Y GUO Y. 2005. Impact of pollen grains from Bt transgenic corn on the growth and development of chinese Tussah silkworm, *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). Environmental Entomology 34: 922-928.

- LOPEZ M., PRASIFKA J., BRUCK D. Y LEWIS L. 2005. Utility of Ground Beetle Species in Field Tests of Potential Nontarget Effects of Bt Crops. Environmental Entomology 34: 1317-1324.
- LOSEY, J.E., RAYOR, L.S., Y CARTER, M.E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. Nature. 399, 6733:214.
- LOZZIA G.C. 1999. Biodiversity and structure of ground beetle assemblages (Coleoptera Carabidae) in Bt corn and its effects on non target insects. Bolletino di Zoologia agrariana e di Bachicoltura, Ser. II, 31:37-50.
- LUDY C. Y LANG A. 2006. Bt Maite pollen exposure and impact on the garden spider, *Araneus diadematus*. Entomologia Experimentalis et Applicata 118: 145-156.
- LUMBIERRES B., ALBAJES R. Y PONS X. 2004. Transgenic Bt Maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance. Ecological Entomology. 29: 309-317.
- 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.
- MCCCLINTOCK, 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.
- MEISSE M. Y LANG A. 2005. Comparing methods to evaluate the effects of Bt maize and insecticide on spider assemblages. Agriculture Ecosystems & Environment 107: 359-370.
- MEISSE M., VOJTECH E. Y POPPY G.M. 2005. Effects of Bt maize-fed prey on the generalist predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). Transgenic Research 14: 123-132.
- 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.
- MULLIN C.A., SAUNDERS II M.C., LESLIE T.W., BIDDINGER, D.J. Y FLEISCHER, S. J. 2005. Toxic and Behavioral Effects to Carabidae of Seed Treatments Used on Cry3Bb1- and Cry1Ab/c-Protected Corn. Environmental Entomology 34: 1626-1636.
- 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.
- 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.
- 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 KUIJPER, 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.
- NOVILLO C., FERNÁNDEZ-ANERO F.J. Y COSTA J., 2003. Resultados en España con variedades de maíz derivadas de la línea MON 810, protegidas genéticamente contra taladros. Boletín Sanidad Vegetal. Plagas, 29: 427-439.
- 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>

- OBRIST L.B., DUTTON A., ALBAJES R., Y BIGLER F. 2006. Exposure of arthropod predators to Cry1Ab toxin in Bt maize fields. Ecological Entomology 31: 143-154.
- 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.
- PHIPPS R. Y PARK J. (2002). Environmental benefits of genetically modified crops – global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. Journal of Animal and Food Sciences 11: 1–18.
- 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.
- PILCHER, C.D., RICE M. Y OBRZYCKI, J. 2005. Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five nontarget arthropods. Environmental Entomology 34: 1302-1316.
- 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>
- PONS X, LUMBIERRES B, LÓPEZ C Y ALBAJES R. 2004. No effects of Bt maize on the development of *Orius majusculus*. GMOs in Integrated Production. IOBC wprs Bulletin 2(3): 131-136.
- PONS X., LUMBIERRES B., LÓPEZ, C. Y ALBAJES R. 2005. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize. European Journal of Entomology, 102: 73-79.
- 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.
- REYES S.G. 2005. Wet season population abundance of *Micraspis discolor* (Fabr.) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Trichoma cnapthalocrosis* Uchida (Hymenoptera: Ichneumonidae) on three transgenic corn hybrids in two sites of the Philippines. Asia Life Sciences 14: 217-224.
- 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.
- RODRIGO-SIMÓN A., DE MAAGD R.A., AVILLA C., BAKKER P.L., MOLTHOFF J., GONZÁLEZ-ZAMORA J.E. Y FERRÉ J. 2006. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. Applied and Environmental Microbiology 72: 1595-1603.
- ROMEIS J., DUTTON A. Y BIGLER, F. 2004. *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). Journal of Insect Physiology, 50: 175-183.

- ROMEIS J., MEISLE M. Y BIGLER F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.
- 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.
- SAXENA D. Y STOTZY G. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1225-1230.
- 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>
- 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.
- SERRA J., LÓPEZ A. Y SALVA J. 2006. Varietats de blat de moro genèticament modificades (GM), amb resistència al barrinadors: Productivitat i altres paràmetres agrònomic. Dossier Tècnic del DARP, Generalitat de Catalunya n° 10: 13-18.
- 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., OBRYCKI, J.J., LEWIS, J., 2001. Assessing the Impact of Cry1Ab-Expressing Corn Pollen on Monarch Butterfly Larvae in Field Studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. <http://www.pnas.org/papbyrecent.shtml>
- STOTZY G. 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil* 266: 77-89.
- TAYLOR, S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol* 39:146-152.
- 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., 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.
- VERCESI M.L., KROGH P.H., Y HOLSTRUP M. 2006. Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*?. Applied Soil Ecology, 32 (2): 180-187.
- 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.
- VOJTECH E., MEISLE M. Y POPPY G.M. 2005. Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Himenoptera: Braconidae). Transgenic Research 14: 133-144.
- VOLKMAR C., Y FREIER B. 2003. Spinnenzönosen in Bt-mais und nicht gentechnisch veränderten Maisfeldern. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 110: 572-582.
- 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. 1984. Fate of the insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. Soil Biol. Biochem. 16(4):357-360.
- 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.
- WHITELEY, H.R. Y SCHNEPP, 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.
- WU, F. 2006. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. Transgenic Research. 15: 277-289.

- 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.
- ZANGERI A.R., MCKENNA D., WRAIGHT C.L., CARROLL M., FICARELLO P, WARNER R. Y BERENBAUM M.R. 2001. Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on Monarch and Black Swallowtail caterpillars under field conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 11908-11912.
- ZWAHLEN C., HILBECK A., HOWALD R. Y NENTWIG W. 2003. Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. Molecular Ecology 12: 1077-108.



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