



Proyecto Desarrollo del Marco Nacional de Bioseguridad

DINAMA – PNUMA – GEF

MAÍZ BT EN URUGUAY:

Elementos para una Evaluación de Riesgos Ambientales

Julio, 2006

Ministro de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

Arq. Mariano Arana

Directora Nacional de Medio Ambiente

Ing. Agr. Alicia Torres

Proyecto de Desarrollo del Marco Nacional de Bioseguridad URU-04-009

Coordinador del Proyecto

Ing Agr. (PhD) Marcos Frommel

Autor

MSc Gonzalo Martínez Crosa

Índice

1.	<i>Introducción</i>	4
2.	<i>Evaluación de Riesgos Ambientales (ERA)</i>	6
3.	<i>Expresión y flujo de la toxina CryIAb en el ambiente</i>	8
4.	<i>Transferencia genética</i>	11
4.1.	<i>Dispersión de polen</i>	11
4.2.	<i>Transferencia horizontal</i>	11
5.	<i>Resistencia</i>	12
5.1.	<i>Especies blanco</i>	12
5.2.	<i>El desarrollo de la resistencia</i>	14
5.3.	<i>Manejo de la Resistencia de Insectos: la estrategia de Dosis Alta/Refugio</i>	14
6.	<i>Riesgos fuera de blanco</i>	19
6.1.	<i>Efectos sobre la biodiversidad</i>	19
6.2.	<i>Consumidores primarios</i>	20
6.2.1.	<i>Herbívoros</i>	20
6.2.2.	<i>Polinizadores</i>	23
6.2.3.	<i>Patógenos del maíz</i>	23
6.3.	<i>Consumidores secundarios</i>	24
6.3.1.	<i>Depredadores</i>	24
6.3.2.	<i>Parasitoides</i>	26
6.4.	<i>Organismos edáficos</i>	28
6.4.1.	<i>Microorganismos</i>	28
6.4.2.	<i>Invertebrados</i>	29
6.5.	<i>Abordaje metodológico</i>	30
7.	<i>Conclusiones y recomendaciones</i>	33
8.	<i>Referencias</i>	35
9.	<i>Anexo</i>	45

1. Introducción

El desarrollo de la biotecnología moderna y sus herramientas para la manipulación de ácidos nucleicos, ha posibilitado la generación de organismos portadores de combinaciones genéticas no disponibles en la naturaleza, a los cuales se les denomina Organismos Vivos Modificados (OVM). Algunas de estas transformaciones implican la introducción y expresión de genes de interés de una especie en el genoma de otra, rompiendo las barreras reproductivas naturales. Los organismos así generados son denominados transgénicos.

Un grupo importante de OVM vegetales está integrado por las plantas transgénicas resistentes a los insectos. La mayoría de los eventos de esta naturaleza contienen genes provenientes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) que expresan productos tóxicos para algunos invertebrados que de ellos se alimentan. Se hará referencia a estas variedades en el presente trabajo como **Cultivos Resistentes a Insectos con genes Bt** (CRI-Bt).

Los CRI-Bt han sido objeto de polémica en los más de diez años que llevan liberados al cultivo comercial (ILSI, 1998; Mellon & Rissler, 1998; Obrycki *et al.*, 2001). Sus defensores argumentan que son ambientalmente seguros por su alta especificidad, que mejoran la calidad del producto (por ej.: al disminuir las vías de entrada de hongos generadores de micotoxinas) y que disminuyen el uso de insecticidas, convirtiéndolos en una de las mejores armas del Manejo Integrado de Plagas (Munkvold *et al.*, 1999; Pimentel & Raven, 2000; Betz *et al.*, 2000; Gamundi *et al.*, 2002; James, 2005; Syngenta, 2004; NK[®] Brand, 2005; Monsanto, 2006a, 2006b, 2006c). El desarrollo de este tipo de OVM que expresan las proteínas Bt compensan una de las limitaciones más frecuentes del uso de formulaciones comerciales de *B. thuringiensis*: la variabilidad en su eficacia debida a la marcada incidencia de factores ambientales como la temperatura, humedad o radiación UV, entre otros (Brousseau *et al.*, 1999).

Por otra parte, dentro y fuera de la comunidad científica han surgido cuestionamientos al uso de estas plantas como cultivos. Las críticas se centran en el peligro que éstos podrían representar para la salud humana así como también para el mantenimiento de los ecosistemas agrícolas y naturales (Snow & Morán-Palma, 1997; Greenpeace, 1999; Marvier, 2001; Obrycki *et al.*, 2001; Scriber, 2001; DSTA-UB-MATT, 2005). Los principales riesgos señalados por la comunidad científica abarcan: la **transferencia genética** desde los organismos transgénicos hacia las variedades convencionales (*i e*: no transgénicas) del cultivo o a especies silvestres emparentadas (Snow, 2002, 2003; Letourneau *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004), el desarrollo de **resistencia** en las especies que se pretende combatir (May, 1993; Gould, 1994; Tabashnik *et al.*, 1991; Tabashnik, 1994a, 1994b; Bauer, 1995; Brousseau *et al.*, 1999; Mellon & Rissler, 1998, ILSI, 1998) y el impacto no intencional de estos cultivos en organismos que no son blanco de control del OVM, incluyendo otros herbívoros (Losey *et al.*, 1999; EPA, 2001; Zangerl *et al.*, 2001; Malone & Pham-Delègue, 2001), enemigos naturales (Orr & Landis, 1997; Hilbeck, *et al.*, 1998a, 1998b, 1999; Losey *et al.*, 2004; Lövei & Arpaia, 2005) y la fauna edáfica (Wandeler *et al.*, 2002; Zwahlen *et al.*, 2003a; Blackwood & Buyer, 2004; Dunfield & Germida, 2004). Se han encontrado evidencias de que la vida media de los productos transgénicos en el ambiente es mayor que la que se suponía en un principio, acumulándose en el suelo y transmitiéndose a través de las redes tróficas (Saxena & Stotzky, 2001a; Saxena *et al.*, 1999, 2002; Evans, 2002; Einspanier *et al.*, 2004; Harwood *et al.*, 2005).

A la luz de estas evidencias, las evaluaciones de riesgo tradicionales resultan insuficientes. Los impactos sobre la estructura y dinámica de los ecosistemas son generalmente sutiles y complejos y operan a escalas de tiempo mayores que los de la producción, por lo que requieren evaluaciones

más sensibles y a mayor plazo (Obrycki *et al.*, 2001; Andow & Hilbeck, 2004; Andow & Zwahlen, 2006, Lövei & Arpaia, 2005; Snow *et al.*, 2005).

En el año 2005 los 21 países que cultivan OVM plantaron más de 400 millones de hectáreas en el mundo. Uruguay se ubica en el noveno lugar con más de 300.000 ha, contribuyendo con menos del 1% al área total mundial cultivada con OVM. La superficie cultivada con OVM aumentó un 11% del 2004 al 2005 (James, 2005).

En Uruguay los primeros ensayos con maíz transgénico se realizaron entre 1995 y 1999. Se evaluaron varios eventos que contenían transgenes Bt y se autorizó la importación y cultivo de los eventos MON 810 y Bt11, los cuales contienen la proteína CryIAb, de acción específica en lepidópteros. Dichos eventos fueron desarrollados para combatir al barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) pero se recomendaron en la región para el control del “barrenador del tallo” *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Fava *et al.*, 2004). Entre los años 2003 y 2004 se sembraron 20.150 ha de maíz MON 810 representando un 29,6 % del área total (estimando 64.200 ha) mientras que para el maíz Bt 11 se sembraron 1.700 ha en el 2004, representando un 2,65 % del área indicada más arriba. Los refugios plantados para estas variedades ocuparon 2.400 ha y 170 ha respectivamente (Frommel *et al.*, 2006). En la última zafra se ensayó en condiciones de campo cultivares híbridos de NK603 x MON810 (tolerancia a glifosato y resistencia a lepidópteros) aunque su liberación al ambiente no ha sido autorizada.

El objetivo del presente trabajo es revisar la última información en la literatura científica arbitrada, los boletines técnicos de los institutos agropecuarios de investigación de la región y los informes gubernamentales internacionales y nacionales sobre el fenómeno del maíz Bt. Se pretende aportar a la discusión del tema en el Uruguay, enmarcando el fenómeno en el contexto ambiental y señalando aspectos de la estructura y dinámica de los ecosistemas de la región. Se describe la metodología de Evaluación de Riesgos Ambientales y se discuten las características de su implementación para el caso del maíz Bt en Uruguay.

2. Evaluación de Riesgos Ambientales (ERA).

El **riesgo** es la combinación de la probabilidad de un acontecimiento adverso (peligro) y el daño correspondiente al mismo (Omenn *et al.*, 1996).

El **Análisis de Riesgo (AR)** es un proceso que involucra tres componentes interconectados: la Evaluación de Riesgos, la Gestión de Riesgos y la Comunicación de Riesgos (FAO/OMS, 2005).

La **Evaluación de Riesgos** es un proceso que basándose en información y metodología técnico-científica determina y caracteriza los riesgos que una nueva sustancia, factor físico o práctica representa para una población o ambiente determinado.

La **Gestión de Riesgos** involucra la selección de una estrategia de acción en respuesta a un riesgo ya caracterizado. Se apoya en la información técnica obtenida de la evaluación pero involucra factores sociales, legales, políticos e incluso económicos (Omenn *et al.*, 1996). En la gestión de riesgo la sociedad determina como éste será asumido. Las decisiones adoptadas en esta instancia involucran tolerar el riesgo tal cual se presenta, convivir con el mismo, elaborando medidas de mitigación o directamente evitarlo (Hilbeck & Andow, 2004). Se trata de una fase fundamentalmente política a diferencia de la anterior.

En base a estas consideraciones, el Codex Alimentarius recomienda que, más allá de la necesaria interacción entre evaluadores y gestores, se asegure una separación funcional entre la evaluación de riesgo y la gestión, a los efectos de preservar la integridad científica de la evaluación, para prevenir confusión sobre las funciones que deben ejercer los evaluadores y gestores y para reducir cualquier conflicto de intereses.

Finalmente, la **Comunicación de Riesgos** es el intercambio de información y opiniones a través de todo el proceso de AR. Este intercambio involucra información sobre los riesgos, factores relacionados y la percepción de los mismos entre los evaluadores, los gestores, los consumidores, la industria, la comunidad académica y otras partes involucradas. Comprende asimismo la explicación de los resultados de la evaluación de riesgo y de los fundamentos de las decisiones adoptadas con la gestión del riesgo. (FAO/OMS, 2005).

La **Evaluación de Riesgos Ambientales** (referida en adelante como ERA) es un proceso que analiza información disponible en un momento dado, para determinar la probabilidad de que la exposición a uno o más estresores cause o haya causado daños al ambiente (EPA, 1998). Un estresor es una sustancia química o variable física pasible de ocasionar daño a organismos o ecosistemas expuestos.

La ERA es una herramienta metodológica flexible, que considera tanto la información disponible como la incertidumbre, para elaborar un modelo interpretativo del conocimiento científico en un momento dado. Esta interpretación permite a los agentes tomadores de decisión imponer acciones tendientes a la reducción de efectos adversos en el ambiente (EPA, 1998).

La ERA puede ser usada para anticipar la ocurrencia de efectos adversos (prospectiva) o para interpretar efectos causados por exposiciones al estresor en el pasado e implementar acciones correctivas (retrospectiva) (CalEPA, 2000).

Históricamente, los riesgos ambientales han sido percibidos una vez que ha ocurrido el daño. El desafío que plantean los OVM es el desarrollo de herramientas de análisis que permitan una ERA de abordaje prospectivo (Andow & Hilbeck, 2004).

Las etapas que comprende una ERA son (Omenn *et al.*, 1996; EPA, 1998):

- (1) Fase de identificación o fase de formulación del problema;
- (2) Fase de análisis: compuesta básicamente de:
 - a. Análisis de la exposición al estresor,
 - b. Análisis de los efectos producidos por el estresor en los organismos o parámetros ambientales expuestos y
- (3) Caracterización del riesgo.

La fase de formulación comprende la elaboración de un modelo teórico acerca de la ocurrencia de efectos ambientales adversos provocados por el estresor en estudio, así como el establecimiento de metas y límites del abordaje. Concluye con el desarrollo de un protocolo de muestreo y análisis para la fase subsiguiente.

La fase de análisis comprende las actividades necesarias para la estimación de los factores de exposición y efectos del estresor en el ambiente, de acuerdo a los supuestos asumidos en la primera fase. En el análisis de exposición se identifican las fuentes del estresor y se modela su distribución en el espacio y en el tiempo. También se cuantifica el contacto o coexistencia con receptores específicos en el ambiente (organismos vivos, suelo, aire, etc.). En el análisis de efectos se cuantifican las respuestas de los receptores a diferentes niveles de exposición al estresor.

Finalmente, durante la caracterización del riesgo se integran los perfiles de exposición al estresor y las respuestas asociadas, determinándose los grados de confianza de los riesgos estimados.

El manejo de la incertidumbre, es decir la falta de información, es un factor clave en todo el proceso de la ERA, especialmente en un abordaje prospectivo.

El principal principio rector que establece el Protocolo de Cartagena (Anexo III) acerca del tratamiento de la incertidumbre es el Principio Precautorio, definido por la agenda 21 (SCDB, 2000) y en nuestro país ratificado por la Ley 17.283 (Art. 6º, Cap. II, apartado B). Este principio prescribe que ante la carencia de información sobre las implicancias ambientales de un determinado factor o proceso se debe adoptar el enfoque más conservador.

Es necesario destacar que la incertidumbre es importante en lo referente a componentes y procesos de los ecosistemas terrestres de nuestro país (Evia & Gudynas, 2001; Grela, 2004). Se carece de macro relevamientos de biodiversidad entomológica, por lo que el nivel de resolución taxonómica es bajo. Asimismo, los estudios de macroecología funcional son escasos en lo que concierne a ecosistemas terrestres.

Tampoco se han elaborado modelos cuantitativos para las principales plagas entomológicas del maíz, ni se han caracterizado los umbrales de daño en muchos casos.

Este vacío de conocimiento debe tomarse necesariamente en cuenta para diseñar metodologías adecuadas.

3. Expresión y flujo de la toxina CryIAb en el ambiente

La bacteria *Bacillus thuringiensis* forma parte de un complejo subespecífico de bacilos grampositivos que se desarrollan en condiciones aeróbicas estando presente generalmente en el suelo en concentraciones de entre 10^2 y 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo (Polanczyk & Alves 2003). Bajo ciertas condiciones restrictivas esporula, sintetizando una gran cantidad de proteínas que forman un cuerpo de inclusión cristalina. Dichas proteínas, llamadas *Cry*, presentan actividad insecticida. Son codificadas por genes *Cry* ubicados en el cromosoma de la bacteria o en plásmidos (Polanczyk & Alves 2003). Actualmente se estima que existen unas 40.000 variedades de cepas Bt con especificidad para diferentes órdenes de insectos, dependiendo de las proteínas *Cry* que expresen (Bauer, 1995).

La acción insecticida de las proteínas *Cry* en un organismo susceptible incluye las siguientes etapas:

- (1) Ingestión de la toxina;
- (2) Disolución de los cristales en medio alcalino: liberación de las protoxinas;
- (3) Hidrólisis de las protoxinas por proteasas específicas convirtiéndose en toxinas activas o δ -endotoxinas;
- (4) Unión de las δ -endotoxinas a sitios específicos en la membrana del mesenterón del insecto blanco;
- (5) Apertura de poros en la membrana, generando un transporte anormal de iones, lo que determina;
- (6) Lisis celular del mesenterón y
- (7) Muerte del insecto por septicemia o inanición.

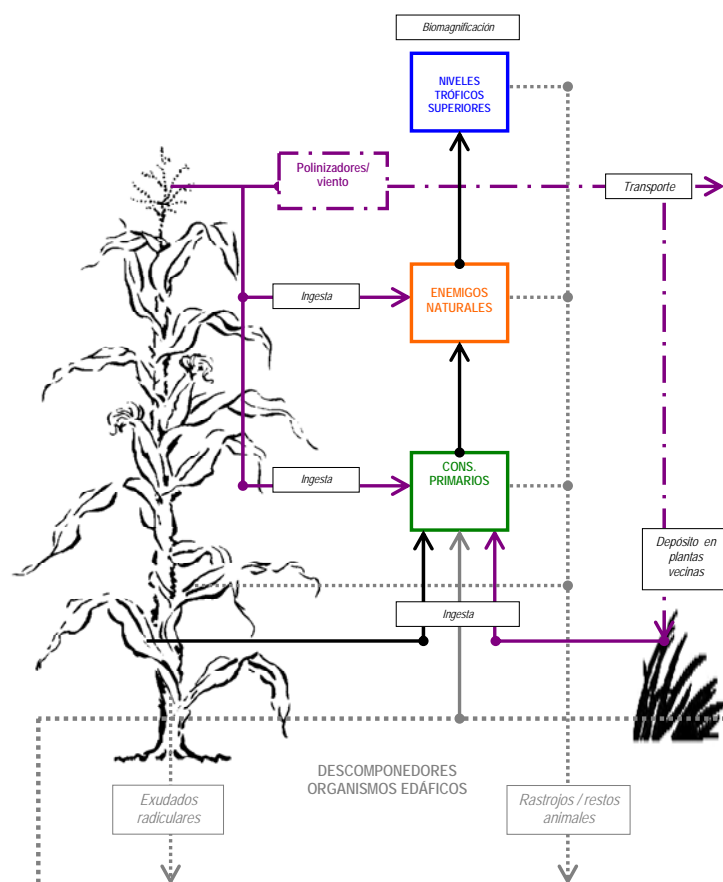
Las proteínas *Cry* se han vuelto particularmente ubicuas en el ambiente debido al uso de insecticidas preparados en base a *B.thuringiensis* y en épocas más recientes a su incorporación en el acervo genético de diferentes cultivos (Hilbeck *et al.*, 1999; Scriber, 2001). Los genes insertados en el maíz Bt corresponden a *B. thuringiensis var kurstaki (Btk)* el cual expresa la toxina *CryIAb* de acción específica contra lepidópteros.

Existen algunas diferencias entre las toxinas expresadas por la bacteria y las contenidas en la planta. En el primer caso las toxinas son liberadas al ambiente como protoxinas, requiriéndose de la acción de un medio alcalino y enzimas (proteasas) para su activación, mientras que los CRI-Bt contienen una forma activada de la proteína (Groot & Dicke, 2002). La expresión de las toxinas en la bacteria se presenta sólo como consecuencia de la esporulación a diferencia de lo que ocurre en los CRI-Bt donde es más o menos constante (Groot & Dicke, 2002; Hilbeck *et al.*, 1999).

Los niveles de expresividad de la toxina dependen del número de promotores y copias que se hayan insertado y esto varía según el evento transgénico del que se trate. Otros factores que condicionan los niveles de toxina en la planta son el estado fenológico, el órgano vegetal, la edad de los tejidos y el número de cloroplastos (Abel & Adamczyk, 2004; Zwahlen *et al.*, 2003b).

La **Figura 1** muestra el ciclo de la toxina en el ambiente. El ingreso al sistema puede darse a través del polen, las partes verdes de la planta, la raíz o los granos. Como la toxina actúa a nivel del mesenterón o intestino medio de los insectos susceptibles, sólo es tóxica por ingestión, por lo que aquellos insectos que tengan contacto con el polen pero que no lo ingieran no sufrirán intoxicación (Polanczyk & Alves, 2003). Esta puede ser la situación para polinizadores que se alimenten de néctar, los cuales actuarían como vectores para la dispersión del polen pero no resultarían afectados por la toxina en forma directa (Groot & Dicke, 2002). Es importante remarcar que la toxina actúa exclusivamente al ser ingerida. Algunos experimentos diseñados para evaluar efectos fuera del blanco no han tenido en cuenta este aspecto (Lövei & Arpaia, 2005).

Figura 1: Vías de ingreso de la toxina en el ambiente



Existen varias estimaciones de la distancia a la que se dispersa el polen en la atmósfera por acción del viento. Uno de los estudios más completos realizados en este sentido concluye que el radio de dispersión del polen abarca unos 60m (Raynor *et al.*, 1972) pero se ha objetado que fue realizado bajo condiciones de viento suave y el resultado ha variado para ensayos realizados en condiciones de viento fuerte (Emberlin *et al.* 1999). Los máximos registros de dispersión de polen viable alcanzan unos 400m (Luna *et al.*, 2001). No obstante, la concentración disminuye por debajo de 20 granos por cm² a los 5 m de la planta (Wraight *et al.*, 2000). La deposición del polen en la flora vecina depende de la dirección predominante del viento, la época y duración de la antesis y las características estructurales de la epidermis de las hojas sobre las que se deposita (Wraight, *et al.*, 2000; Zangerl *et al.* 2001; Groot & Dicke, 2002). La lluvia lava buena parte del polen depositado (Zangerl *et al.*, 2001). Un resumen de las distancias encontradas en la literatura se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Concentraciones de polen de maíz a diferentes distancias de su centro de dispersión

Distancia (m)	Sobre	Evento	Concentración (granos/cm ²)	Fuente
0,5	Planta no especificada	MON810 (Pioneer34R07)	210	Wraight <i>et al.</i> , 2000.
1,0	Planta no especificada	MON810 (Pioneer34R07)	60-80	Wraight <i>et al.</i> , 2000.
0,5	<i>Asclepias curassavica</i>	176	260	Zangerl <i>et al.</i> , 2001.
1,0	<i>A. curassavica</i>	176	170	Zangerl <i>et al.</i> , 2001.
0,5	<i>Pastinaca sativa</i>	176	320	Zangerl <i>et al.</i> , 2001.

Las empresas productoras de CRI-Bt han aportado datos de las concentraciones de toxina en las partes verdes (Monsanto, 2006c) y estas cifras han sido adoptadas como datos oficiales por las agencias gubernamentales (ANZFA, 2000; EPA, 2001). Sin embargo, las mediciones realizadas en diferentes trabajos científicos muestran una variabilidad importante en las cifras obtenidas, muchas veces mayores a las publicadas por dichas agencias. En la **Tabla 2** se resumen algunos de los datos más relevantes.

Tabla 2: Concentración de CryIAb en diferentes zonas de la planta y el ambiente.

Zona	Evento	Cantidad	Fuente
Muestras de suelo	Bt11 (NK4640Bt)	95 µg/g	Saxena <i>et al.</i> , 1999.
Raíz joven	MON 810	20,2 µg/g (de proteína total)	EPA, 2001.
Tejido verde liofilizado	MON810	50,6 µg/g	EPA, 2001.
Tejido verde fresco	MON 810	6,27 µg/g	EPA, 2001.
Hojas verdes secas	Bt 11	15,4±4,3 µg/g	Zwahlen <i>et al.</i> , 2003b.
Polen	Bt 176	1,4-2.3 µg/g	EPA, 2001.
Polen	Bt 11	0,33 µg/g	Sears <i>et al.</i> , 2000.
Polen	MON810	0,09 µg/g	EPA, 2001; Sears <i>et al.</i> , 2000.
Polen	MON810 (Pioneer34R07)	0,02125 ±0,0002 µg/g	Wraight <i>et al.</i> , 2000.

En virtud de esta evidencia se considera necesario estimar las concentraciones de toxina expresadas por las plantas en nuestras condiciones de campo.

Se ha registrado la deposición en el suelo de toxina proveniente de rastrojos del cultivo (Zwahlen *et al.*, 2003b) y a través de exudados radiculares, aunque los investigadores no se ponen de acuerdo sobre la naturaleza de esos exudados y su concentración (Saxena & Stotzky, 2001a; Saxena, *et al.*, 1999, 2002 pero *cf.* críticas en EPA, 2001).

La CryIAb puede persistir en el suelo bioactiva por al menos 200 días, ligada a las arcillas presentes en el sustrato (Saxena *et al.*, 2002; Zwahlen *et al.*, 2003b) pero existen estudios que se contraponen a los anteriores (Dubelman *et al.*, 2005).

Es posible la exposición de lepidópteros a estas toxinas retenidas en el suelo ya que las especies de este orden acostumbran ingerir líquidos del suelo para complementar su ingesta de agua y sales (Bernays & Chapman, 1994).

Existen también evidencias de **bioacumulación** (*ie*: incorporación de la toxina en los tejidos de los animales que se alimentan de plantas Bt) y **biomagnificación** (concentración en las redes tróficas) (Wandeler *et al.*, 2002; Zwahlen *et al.*, 2003a; Harwood *et al.*, 2005).

En resumen, dentro de los elementos a considerar en un análisis de exposición ambiental de la toxina CryIAb de maíz Bt se debe incluir:

- (1) El ingreso de la toxina al sistema a través de las diferentes partes de la planta, cuantificando las concentraciones para diferentes eventos y las fluctuaciones en la expresividad durante el ciclo de la planta;
- (2) la dinámica de la dispersión del polen (considerando viento y polinizadores), generando modelos para los gradientes de concentración de toxina en el suelo y en la vegetación vecina;
- (3) la liberación de toxina por las raíces y su incorporación al suelo, estimando vida media para diferentes tipos de suelo.

4. Transferencia genética

Los efectos adversos vinculados a la transferencia genética implican la diseminación no intencional de la construcción genética de un OVM hacia otras poblaciones, mediante mecanismos biológicos naturales como la reproducción sexual o la transferencia horizontal (Poverene & Ureta, 2004).

4.1. Dispersión de polen

La dispersión del polen de un CRI-Bt implica riesgos para el ambiente por el entrecruzamiento potencial con variedades o especies silvestres emparentadas y la eventual formación de malezas (Snow, 2002; Letorneau, *et al.*, 2003) o la contaminación de cultivos no modificados de la misma especie.

El maíz, *Zea mays* L., es una especie que presenta un alto grado de alogamia: aproximadamente el 95% de las semillas se producen por fecundación cruzada (Giménez, 2001). Tal como se expuso en el apartado anterior, si bien los modelos más pesimistas plantean dispersión de polen por encima de los 250 m en general se considera esta distancia como la máxima posible para la fecundación cruzada en el maíz.

No existe riesgo de hibridación del maíz con especies silvestres en nuestro país ni en la región sudamericana (Giménez, 2001). El maíz sólo exhibe compatibilidad genética con miembros del género *Zea*, básicamente los teosintes, gramíneas presentes sólo en México y extendiéndose por Centroamérica hasta Nicaragua (Sánchez & Ruiz, 1996).

Otro riesgo potencial es la contaminación por transferencia genética de variedades convencionales de maíz (*ie*: no transgénicas) utilizadas por otras prácticas culturales (agricultura tradicional u orgánica).

La dimensión espacial de la transferencia genética del maíz debe ser tenida en cuenta para elaborar estrategias de aislamiento que aseguren la coexistencia de las diferentes prácticas culturales del maíz a escala local. La posibilidad de coexistencia de los cultivos Bt con las prácticas tradicionales constituye un punto de conflicto entre las partes involucradas y ha sido puesto en tela de juicio por parte de la comunidad científica (Altieri, 2005).

En Uruguay se estableció como distancia de aislamiento y amortiguación 250 m entre los cultivos Bt y otros cultivos (Resoluciones del MVOTMA 236A/003 y 276/003 referentes a MON810 y 292/004 referente a Bt11).

4.2. Transferencia horizontal

La transferencia horizontal de genes (THG) implica el flujo de información genética hacia un organismo procariota por medio de un proceso de transformación (Brock & Madigan, 1993)

Se ha demostrado la transferencia de genes Cry desde *B.thuringiensis* a otras especies bacterianas, probablemente debida a elementos transponibles. Sin embargo, no existe evidencia de THG desde el maíz Bt hacia microorganismos (Kleter *et al.*, 2005).

5. Resistencia

5.1. Especies blanco

Se considera **especie blanco** o especie objetivo aquella para la cual fue diseñado un determinado CRI-Bt. Los eventos transgénicos liberados en nuestro país (MON810 y Bt11) tienen como blanco original el “Barrenador Europeo del maíz (European Corn Borner o ECB)” *Ostrinia nubilalis*. Esta especie no se encuentra presente en la región neotropical. La liberación al ambiente de estos eventos ha sido justificada por el control que los mismos ejercerían sobre otras especies de lepidópteros plaga en Uruguay: el “barrenador del tallo” o “barrenador de la caña de azúcar” *Diatraea saccharalis* y la “lagarta cogollera” u “oruga militar” *Spodoptera frugiperda* (Smith).

Existen al menos 8 especies de lepidópteros que se alimentan de maíz en Uruguay, considerando las que lo hacen de sus granos almacenados (Biezanko *et al.*, 1957; Biezanko *et al.*, 1974, 1978; Bentancourt & Scatoni, 1989, 2003) de las cuales sólo dos son mencionadas hasta 1995 como plagas de importancia económica: *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) y *S. frugiperda* (Zerbino & Fassio, 1995). El “barrenador del tallo” *D. saccharalis* junto a la “lagarta elasmó” *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) y la “lagarta de la espiga” *Helicoverpa zea* (Boddie) se consideran plagas de menor interés

“(…) ya sea porque no causan pérdidas económicas muy grandes o porque sus ataques no son frecuentes…”
(Zerbino & Fassio, op.cit., pág. 1).

La cortadora *A. ipsilon* tiene un comportamiento muy variable, presentando fluctuaciones poblacionales importantes de un año a otro (Bentancourt & Scatoni, 2003).

Se considera a *S. frugiperda* la más importante desde el punto de vista económico por la permanencia de la misma en los cultivos y el ataque tanto a nivel de la implantación donde actúa como cortadora, como en las fases vegetativa (cogollo) y reproductiva (espiga) del cultivo (Bentancourt & Scatoni, 1989, 2003; Zerbino & Fassio, 1995). Existe, empero, una carencia importante de estudios de fenología de las poblaciones en la región, aunque se ha constatado variación en los parámetros poblacionales de acuerdo a la dieta (Murúa & Virla, 2004). En el **Anexo 1** se puede consultar un resumen de la biología de estas tres especies.

Nuestros sistemas de producción agrícola – ganaderos aseguran un mosaico de hábitats que permiten la coexistencia de los enemigos naturales todo el año, manteniendo las poblaciones de estos insectos en general por debajo del umbral de daño económico, a diferencia de los sistemas de explotación argentinos basados en el monocultivo sin rotación (Ribeiro, 2000).

Uno de los datos imprescindibles para evaluar la eficacia de un CRI- Bt es el nivel de toxicidad del mismo en los insectos blanco. Recientes estudios de rentabilidad realizados en el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina) comparando diferentes manejos de cultivares de maíz muestran ventajas económicas en el uso de tecnologías de control químico basadas en la detección temprana de niveles de daño y el uso racional de pesticidas para el caso de *D. saccharalis* (Iannoni *et al.*, 2004). Por otra parte, la cuantificación de la toxicidad en forma directa es necesaria para elaborar el programa de manejo de resistencia, tal como se discutirá más adelante. En la **Tabla 3** se recopilan algunas dosis letales revisadas por la agencia de Recursos Naturales de Canadá (van Frankenhuyzen & Nystrom, 2002).

Tabla 3: Datos de toxicidad de CryIAb para diferentes especies de lepidópteros

Especie	Ensayo ¹	Instar ²	LC ₅₀	Rango	Unidades	Fuente
<i>Agrotis ipsilon</i> *	Dieta	N	>80000		ng/ml	NRC ³
<i>Bombyx mori</i>	Esparcido	L3	61	48-76	ng/ml	NRC
<i>B. mori</i>	Esparcido	L3	220	194-248	ng/ml	NRC
<i>B. mori</i>	Esparcido	L3	342	306-453	ng/ml	NRC
<i>Bombyx mori</i>	Esparcido	L3	20	15-22	ng/ml	NRC
<i>Cydia pomonella</i>	Esparcido	N	29200	10700-233000	ng/ml	NRC
<i>Danaus plexippus</i>	Dieta	L1	3,3	2,2-4,8	ng/ml	NRC
<i>D. plexippus</i>	Dieta	L3	35,1	30-106	ng/ml	NRC
<i>D. plexippus</i>	Dieta	L4	>100		ng/ml	NRC
<i>D. plexippus</i>	Polen 175	L	389		granos /cm ² (LD50)	Sears <i>et al.</i> , 2000.
<i>Diatraea grandiosella</i>	Polen MON810	¿		0,08-0,15	mg/g	Wolt <i>et al.</i> , 2003
<i>D. saccharalis (in vitro)</i>	Dieta	N	0,38	0,28-0,54	mg/kg	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Diatraea saccharalis (in situ)</i>	Dieta	N	0,27	0,21-0,34	mg/kg	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Helicoverpa zea</i>	Esparcido	L1	74	52-114	Ng/cm ²	NRC
<i>Helicoverpa zea</i>	Esparcido	N	1690	1300-2430	ng/cm ²	NRC
<i>Helicoverpa zea</i>	Esparcido	N	3490		ng/ml	Luttrell <i>et al.</i> , 1999.
<i>Heliothis virescens</i>	Esparcido	L1	1,5	0,8-2,3	ng/cm ²	NRC
<i>Heliothis virescens</i>	Dieta	N	200		ng/ml	NRC
<i>Heliothis virescens</i>	Esparcido	N	68	57-82	ng/cm ²	NRC
<i>Manduca sexta</i>	Polen Bt11 (Nk4640Bt)	¿	5,2		µg/g	Saxena <i>et al.</i> , 1999.
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Dieta	L1	290	120-590	ng/ml	NRC
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Esparcido	N	27	22-35	ng/cm ²	NRC
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Dieta	N	0,028	0,021-0,033	mg/kg	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Plutella xylostella</i>	Esparcido	L3	14000	490-90000	ng/ml	NRC
<i>Plutella xylostella</i>	Esparcido	L3	3,9	3,3-4,7	ng/cm ²	NRC
<i>Plutella xylostella</i>	Esparcido	N	1450	1150-1780	ng/cm ²	NRC
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Esparcido	¿	95890		ng/ml	Luttrell <i>et al.</i> , 1999
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Dieta	N	95890		ng/ml	NRC
<i>Trichoplusia ni</i>	Dieta	N	1230	900-1820	ng/ml	NRC
<i>Trichoplusia ni</i>	Esparcido	N	3,4	2,3-4,0	ng/cm ²	NRC
<i>Lombrices (earthworms, especie no determinada)</i>	Dieta (derivado de E. coli) 14 días.	A	>200		mg/kg (ppm)	EPA, 2001

1 Dieta: material incorporado en la dieta, Esparcido: preparaciones de Btk esparcidas sobre el alimento // 2 N: neonato; Lx: larva en el instar x; A: adulto // 3 van Frankenhuyzen & Nystrom, 2002

Las concentraciones letales (LC₅₀) estimadas para *S. frugiperda* y *A. ipsilon* se ubican por encima de los 80.000 ng/ml (Luttrell *et al.*, 1999). Aunque *S. frugiperda* figuraba en la lista de blancos de los eventos MON810 y Bt11 actualmente se considera que estos eventos expresan dosis por debajo del nivel necesario para complementar una estrategia de refugios que minimice la aparición de resistencia tal como se explicará en el apartado siguiente (EPA, 2001) por lo que se está experimentando con nuevos eventos o incluso con el apilamiento de varios genes *Cry* en un mismo vegetal (Buntin, Flanders & Lynch, 2004; Buntin *et al.*, 2004). En lo que respecta a *D. saccharalis* trabajos recientes estiman LC₅₀ unas 38 veces superior a la de *O. nubilalis*, cuestionando la calidad de Dosis Alta del evento MON 810 (Huang *et al.*, 2006).

Las dosis letales para los insectos blanco de los eventos liberados no fue considerada en los informes técnicos elaborados por la CERV (CERV, 2002).

5.2. El desarrollo de la resistencia

Uno de los argumentos de peso para el cultivo de CRI-Bt es que representan una alternativa menos perjudicial desde el punto de vista ambiental que el uso masivo de pesticidas químicos de amplio espectro (Betz *et al.*, 2000; Pimentel & Raven, 2000; EPA, 2001; James, 2005), los cuales son tóxicos para humanos y otros seres vivos, persisten en el ambiente y además generan rápidamente resistencia en los insectos blanco a causa de su aplicación masiva y en grandes cantidades.

La **resistencia** a un pesticida se define como la **capacidad hereditaria de algunos individuos dentro de una población para sobrevivir y reproducirse después de la aplicación de un pesticida (Adaptado de Ríos, 2005)**. Dicha capacidad se adquiere evolutivamente como respuesta a la presión selectiva provocada por la exposición constante a dicho pesticida (Siegfried, 2000). La resistencia a los pesticidas químicos es un serio problema ya que se ha comprobado la fijación de genes de resistencia en más de 500 especies de insectos (Georghiou & Lagunes-Tejeda, 1991).

Desafortunadamente, el aumento de las áreas cultivadas con CRI-Bt a nivel mundial y la constante expresión de los genes *Cry* en las plantas, convierten al desarrollo de resistencia en una mera cuestión de tiempo (ILSI, 1998; Gould *et al.*, 1998; Brousseau *et al.*, 1999).

El desarrollo de resistencia a las toxinas *Cry* fue reportado inicialmente en el lepidóptero *Plodia interpunctella* (Hübner) en granos de maíz tratados con insecticidas Bt (Mc Gaughey, 1985). Luego siguieron una serie de observaciones de resistencia en laboratorio para esta especie (Mc Gaughey & Whalon, 1992), así como para *Trichoplusia ni* Hübner (Estada & Ferré, 1992) y *Spodoptera exigua* (Hübner) (Moar *et al.*, 1995) entre otras, así como la comprobación de resistencia *in situ* para *Plutella xylostella* (L.) (Tabashnik *et al.*, 1990). Incluso se ha reportado resistencia *in vitro* en poblaciones de *O. nubilalis* (Huang *et al.*, 1997) el insecto para el cual fueron desarrollados estos eventos.

Muchos investigadores han conjeturado que la constante permanencia en el tiempo que representan los CRI-Bt acelerará la selección de resistencia a las toxinas *Cry* más rápido que las aplicaciones convencionales con mezclas Bt (Van Rie, 1991; Mc Gaughey & Whalon, 1992; Mc Gaughey, 1994; Tabashnik, 1994a; Gould, 1988).

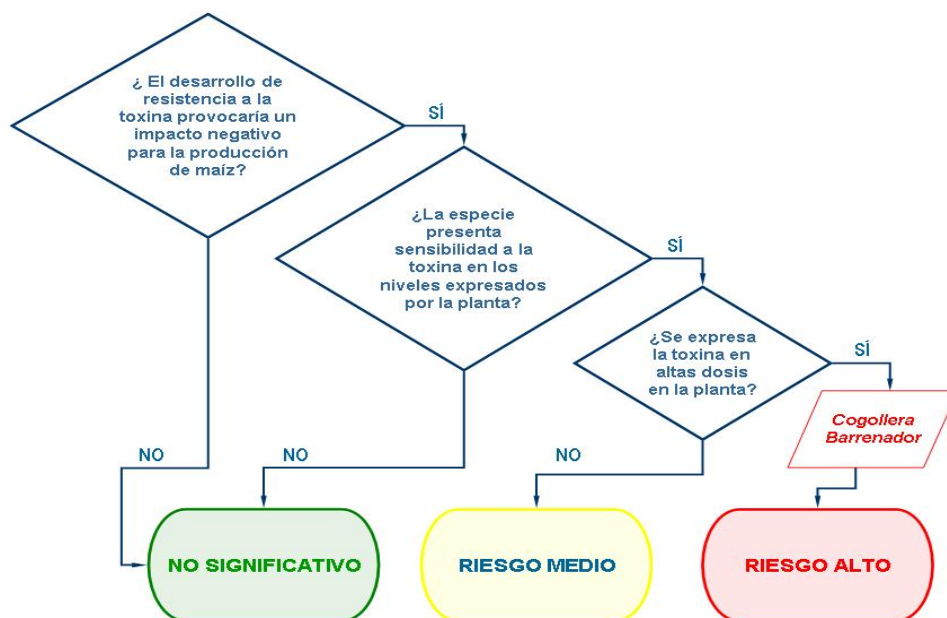
5.3. Manejo de la Resistencia de Insectos: la estrategia de Dosis Alta/Refugio

Como contraparte necesaria para retrasar el desarrollo de resistencia en los insectos blanco se han propuesto numerosas medidas dentro de un Programa de Manejo de Resistencia de Insectos plaga (MRI). Algunas de estas medidas son la rotación de toxinas, la producción de variedades que contengan una combinación de toxinas (OVM con genes apilados), la selección de eventos que expresen dosis muy altas o la combinación de eventos con dosis altamente tóxicas y la plantación de refugios (Brousseau *et al.*, 1999). Se considerará la estrategia de Dosis Alta/ Refugio por ser la más estudiada y la única implementada en los cultivos de nuestro país.

La probabilidad de que un fitófago desarrolle resistencia a una determinada toxina presente en un vegetal está directamente relacionada al tiempo de exposición del fitófago a esta planta y al área ocupada por la planta (Strong *et al.*, 1984). Conforme aumente la exposición en el tiempo y espacio se seleccionará un mayor número de individuos resistentes. El aumento de la eficacia biológica que este carácter otorga en presencia de la toxina supondrá una mayor contribución en la siguiente generación de estos individuos, con lo que si la presión selectiva se mantiene, el carácter quedará finalmente fijado en la población. Se presenta en la **Fig. 2** un diagrama de flujo

para evaluar riesgos asociados al desarrollo de resistencia en insectos para plantas que contienen solo un gen (el caso de los eventos introducidos en nuestro país). Si se sigue este árbol de decisión ingresando los datos existentes sobre nuestra situación, el escenario que se plantea en este momento es de alto riesgo de desarrollo de resistencia para las dos especies que se pretende controlar con este paquete tecnológico.

Figura 2: Árbol de decisión para plantas con una proteína Bt activa.



Adaptado de ILSI (1998)

Un **refugio** es una porción del cultivo que se ha sembrado con una variedad no Bt del mismo ciclo y en la misma fecha de siembra que el cultivo Bt (CUS, s/fecha). La meta de estos refugios es minimizar la selección de individuos resistentes, proveyendo de un stock de individuos susceptibles que se mezclen con aquéllos (Tabashnik, 1994b).

La implementación de refugios como parte de un plan de MRI requiere establecer ciertas características:

Naturaleza de los refugios. En el modelo clásico se procuraba que los vegetales que componían el refugio fueran de idénticas características a las variedades Bt, pero sin el evento, y que fueran sembrados en una misma época (Tabashnik, 1994b). Una alternativa que podría considerarse implica la construcción de refugios con otras especies de plantas hospederas de los insectos blanco (Gould & Tabashnik, 1998). Esta alternativa fue considerada en Uruguay previendo que en el caso de *S.frugiperda* de hábitos polípagos, las gramíneas circundantes al cultivo funcionarían como refugios restringiendo la construcción de los mismos para *D.saccharalis*. Sin embargo, los insectos polípagos presentan tendencia a seleccionar como planta para oviposición aquella sobre la cual nacieron (Jolivet, 1992). La diferenciación alélica observada entre poblaciones de *O.nubilalis* colectadas en maíz y en otras plantas hospederas no cultivadas podrían apoyar esta teoría (Martel *et al.*, 2003) y evidenciar procesos de especiación simpátrida en dichas poblaciones.

Configuración espacial y proximidad. La distribución espacial depende de la movilidad de las especies blanco, por lo que antes de tomar decisiones a este respecto es necesario conocer en profundidad los patrones de distribución espacial y de movilidad de las especies que se quiere manejar (ver “Factores genéticos y ecológicos a considerar en un plan de MRI”, en el recuadro).

Factores genéticos y ecológicos a considerar en un plan de MRI (adaptado de Gould & Tabashnik, 1998):

1. Nº de generaciones expuestas
2. Porcentaje de la población expuesta en cada generación
3. Mortalidad causada por la toxina en individuos heterocigotas
4. Movilidad del adulto y patrones de apareamiento
5. Movilidad de la larva
6. Frecuencia inicial de los alelos de resistencia en la población blanco
7. Eficacia biológica (fitness) de los individuos portadores de genes de resistencia en presencia y ausencia de la toxina

Proporción. En los primeros documentos elaborados sobre el tema se consideraba que el carácter reducido de los cultivos Bt no hacía necesaria la elaboración de refugios. A medida que la extensión de estos cultivos fue aumentando también lo hizo la proporción de refugios, pero la imposibilidad en muchos casos de establecer condiciones iniciales vuelve muy incierta cualquier afirmación categórica al respecto. El punto de vista que se maneja actualmente toma como base las frecuencias alélicas planteadas como iniciales para la resistencia (suponiendo

que ésta es monogenética) y aplicando la ley de Hardy – Weinberg considera que un tamaño mínimo de refugio debe asegurar una proporción de 500:1 de adultos emergidos en el refugio con respecto a los del cultivo Bt (Tabashnik, 1997; EPA, 1998; EPA, 2001). El número de adultos emergentes va a depender del tamaño de los refugios y de la toxicidad de la dosis expresada, así como del manejo de ambos cultivos (p.ej: el uso de insecticidas en el refugio). Los modelos más prudentes elaborados para la situación norteamericana (ILSI, 1998) plantean tres escenarios de riesgo atendiendo a lo expresado y a la extensión de los cultivos Bt en los alrededores. De acuerdo a esta categorización nuestros cultivos entrarían en la franja de riesgo alto para lo cual este estudio prevé proporciones de entre un 40 a 60% del cultivo destinado a refugio en cultivos de más de 1500m de largo. No obstante se ha enfatizado la necesidad de ajustar las proporciones con un monitoreo *in situ* de la resistencia. En Uruguay es obligatoria la implementación de refugios correspondiendo a un mínimo del 10% del cultivo total (Res.Min. 236A/003, 276/003 y 292/004). Esta cifra no se basa en experiencias científicas *in situ* y es incluso menor a la recomendada actualmente por las empresas productoras de los eventos (Monsanto, 2006a, 2006b; NK® Brand, 2005).

La correcta implementación de refugios es un punto crucial en un programa de MRI por lo que ha sido ampliamente discutida por la comunidad científica (ILSI, 1998; Mellon & Rissler, 1998). La estrategia de Dosis Alta / Refugio parte de un modelo en el que se realizan los siguientes supuestos:

1. la resistencia es monogenética y su frecuencia inicial (antes de la introducción del CRI-Bt) es muy baja; $p = 10^{-2} - 10^{-3}$ (Tabashnik, 1997).
2. el gen de resistencia es recesivo (sólo se expresa en homocigosis) por lo que los individuos heterocigotas serán susceptibles a la toxina.
3. se conocen los patrones de distribución espacial y la movilidad de las especies blanco.
4. la dinámica espacial de la reproducción es aleatoria (el insecto no distingue entre una planta Bt y una no Bt para aparearse).
5. la oviposición del insecto blanco es aleatoria (el insecto ovipone de la misma manera en plantas Bt y en no Bt).

Basándonos en estos supuestos y a la luz de la evidencia científica relevada podemos hacer las siguientes consideraciones:

1. No se encontró información disponible sobre la forma en la que se transmiten los genes de resistencia en *D.saccharalis* ni sobre cuáles son las frecuencias iniciales de estos alelos en las poblaciones silvestres. En general la expresión fenotípica del gen de resistencia es una mutación en los receptores a las toxinas Cry que impide su unión a las células

epiteliales del mesenterón (Tabashnik, 1997; Masson *et al.*, 1999) pero se han encontrado casos de resistencia que no responden a este modelo (Brousseau, *et al.*, 1999). Tabashnik *et al.* (1997) encontraron un gen presente en un 20% de la población silvestre de *Plutella xylostella* que confería resistencia cruzada para cuatro toxinas Cry. Existen poblaciones de *S.frugiperda* resistentes desde la implantación de los cultivos Bt en Estados Unidos (Buntin, Flanders & Lynch, 2004). En nuestro país se encuentra un 13% de plantas MON810 dañadas contra un máximo de 95 % en los refugios (Casella, 2004).

2. Se ha encontrado dominancia parcial de los genes de resistencia para algunas especies en experiencias *in vitro*. Se ha reportado para *CryIII A* en *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Cerambycidae) (Rahardja & Whalon, 1995) como también en *Heliothis virescens* para *CryIAb* (Sims & Stone, 1991) y en *P. xylostella* para *CryIC* (Liu & Tabashnik, 1997). Para que se cumpla el supuesto de recesividad, se seleccionan eventos que contengan **dosis altas** de la toxina. Se ha discutido qué concentración debe considerarse; se establece en algunos casos como dosis alta aquélla que contiene 25 veces la concentración necesaria para matar larvas susceptibles (Gould, 1994) aunque otros autores consideran que debería elevarse a 50 veces a la luz de la información publicada sobre resistencia a insectos (Caprio *et al.*, 2000 *cit. in* Andow & Zwahlen, 2006). **Esta condición no se cumple (con ninguno de los dos criterios) para *S. frugiperda* (Buntin, Flanders & Lynch, 2004; Buntin, All, Dewey & Wilson, 2004) ni para *D. saccharalis* (Huang *et al.*, 2006).**
3. Se han realizado algunos estudios de *D. saccharalis* vinculada a caña de azúcar pero no hay estudios específicos de biología en cultivos de maíz en el país al momento. Por sus hábitos endofíticos esta especie está mucho más expuesta a la toxina que *S.frugiperda*.
4. La ausencia de estudios sobre los patrones de cortejo y apareamiento en *D.saccharalis* no permiten estimar *a priori* si existe una selección de la planta en función de la presencia o ausencia de *CryIAb*. En la selección de plantas para cortejo intervienen una serie de características como la arquitectura foliar, el nivel de daño, los compuestos volátiles emitidos por la planta hospedera y la presencia de enemigos naturales (Jolivet, 1992). Experimentos recientes realizados en condiciones de campo sobre poblaciones de *O. nubilalis* demuestran que existe un número significativo de cópulas previas a la dispersión a escala local (Dalecky *et al.*, 2006). El apareamiento previo a la dispersión entre áreas Bt y refugios no ha sido considerado en la calibración de la estrategia.
5. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de oviposición de *O.nubilalis* en maíz Bt y no Bt, sí hubo una disminución significativa en la viabilidad de los huevos en las puestas realizadas sobre Bt (Orr & Landis, 1997). Esta evidencia cuestiona la idea de que el nacimiento ocurre en la misma proporción en ambos sectores del cultivo. Resta saber si tal disminución de la natalidad ejerce a su vez algún tipo de presión sobre el huevo, porque de ser así se estaría generando un nuevo factor de selección que podría generar nueva inestabilidad en la población a largo plazo.

La distribución espacial heterogénea de la toxina en las mazorcas podría darle una oportunidad a las especies que se alimentan de éstas (en nuestro caso *S. frugiperda*) para desarrollar respuestas comportamentales que le permitan evitarla, acelerando la adquisición de resistencia, tal como fue supuesto en un estudio en *Helicoverpa zea* (Horner *et al.*, 2003). En *H.zea* la alimentación con maíz MON810 reduce la tasa de canibalismo modificándose la supervivencia de las poblaciones que viven en ese cultivo (Horner & Dively, 2003). Esta evidencia adicional apunta a que el comportamiento de las especies no es igual en el maíz Bt que en el refugio, conformando poblaciones con diferentes parámetros de supervivencia y por lo tanto teniendo una dinámica diferente. Este factor debería también ser tomado en cuenta para calcular los tamaños efectivos de los refugios.

En resumen, los supuestos formales en los que se basa el modelo de implementación de refugios no se cumplen en una serie de escenarios y en ningún caso son generalizables para situaciones nuevas, sin la debida investigación.

Aparte de los aspectos científicos formales de la implementación de refugios se han planteado otros reparos y críticas.

Un concepto básico del manejo integrado de plagas es usar una estrategia de manejo sólo cuando las poblaciones de la plaga exceden un nivel crítico (Obrycki *et al.*, 2001). El cultivo de una variedad transgénica resistente a los insectos debería considerarse sólo si las pérdidas económicas debidas a los insectos plaga así lo justifican. Esto ocurre en Estados Unidos donde el costo económico y en salud humana y ambiental de controlar a *O. nubilalis* mediante insecticidas convencionales es muy importante y superior comparado con el uso de CRI-Bt (Pimentel & Raven, 2000) pero no se justifica si el daño producido por *D. saccharalis* no es el principal problema en el cultivo de maíz en el Uruguay (Zerbino & Fassio, 1995) y si existen formas de control basadas en el monitoreo y aplicación de químicos que reportan ventajas económicas (Iannoni *et al.*, 2004).

Este hecho motivó un informe por parte de la Facultad de Agronomía en contra de la siembra en Uruguay de estas variedades por considerar que no había beneficios directos que compensaran el riesgo potencial de este tipo de explotación (Facultad de Agronomía, 2002). En dicho informe se critica la ausencia de ensayos de laboratorio y de campo para evaluar la vulnerabilidad de estas especies a los CRI-Bt. No debemos olvidar que el uso de insecticidas en forma preventiva es uno de los factores que más contribuye al desarrollo de resistencia (Bauer, 1995).

En el caso de *S. frugiperda* quien es reportada como la especie de mayor importancia económica en el país la situación podría ser más grave ya que los niveles de toxicidad en los eventos MON810 y Bt11 son bajos para esta especie (cf. **Tabla 3**). El uso de dosis bajas de toxina (relativas a las LC₅₀ reportadas para la especie blanco) podría acelerar, bajo ciertas condiciones, el desarrollo de resistencia (Brousseau *et al.*, 1999). **Esto constituye el mayor riesgo potencial en lo que respecta a los insectos blanco en nuestro país.**

Finalmente, debemos considerar que la separación efectiva de parches con dosis altas de toxina (el cultivo) y parches no tóxicos (el refugio) no es absoluta. La contaminación de los refugios con polen proveniente de las plantas Bt genera un escenario con parches que ofrecen dosis escalonadas de las toxinas (Ma *et al.*, 2004). Se ha detectado la expresión de toxinas *Cry* en refugios de maíz hasta a 31m de las plantas Bt encontrándose además un 45 % de granos positivos para la toxina en plantas del refugio a 2m de las plantas Bt (Chilcutt & Tabashnik, 2004). Este escenario en *dégradée* podría acelerar la resistencia aumentando el rango espacial de exposición pero además exponiendo a los individuos a niveles intermedios que podrían elevar la dominancia funcional de la resistencia (lo cual cancela el supuesto 3 del modelo). El riesgo potencial sería considerable para *S. frugiperda* porque esta especie se alimenta de los granos en ciertos estadios (Willink *et al.*, 1991; Bentancourt & Scatoni, 2003).

6. Riesgos fuera de blanco.

La expresión riesgos fuera de blanco, traducción del inglés *non target risk*, se refiere a los impactos no intencionales sobre el ambiente receptor de un OVM vegetal. Comprende así alteraciones en la biodiversidad, efectos a nivel de las redes tróficas y alteración de procesos ecosistémicos a nivel de suelo.

6.1. Efectos sobre la biodiversidad

La biodiversidad es la

"(...) variabilidad entre organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; (...)"

(SCDB, 1993, Art. 2).

Esta variabilidad se expresa al nivel de individuos en una población, de especies en una comunidad, o de ecosistemas en una región. Existe preocupación acerca de los riesgos que pueden significar los CRI-Bt para la diversidad debido a que los mismos se insertan en agroecosistemas, los cuales ya contienen una diversidad degradada (Krebs *et al.*, 1999). El principal desafío de una ERA está en poder discriminar la variación natural de los cambios provocados por el cultivo de OVM en la abundancia de genotipos, especies y procesos ecosistémicos (Andow & Zwahlen, 2006). Esta naturaleza multidimensional de la biodiversidad dificulta la implementación de los estudios y oscurece la interpretación de sus resultados.

Un punto de partida aceptable podrían ser los estudios comparativos de riqueza específica instantánea. La riqueza específica de una comunidad ha sido utilizada como un indicador eficiente de la diversidad con fines comparativos (Magurran, 1998). Se ha estandarizado una metodología para los muestreos, especialmente en lo relativo a entomofauna (Colwell & Coddington, 1994; Coddington *et al.*, 1996; Gotelli & Colwell, 2001).

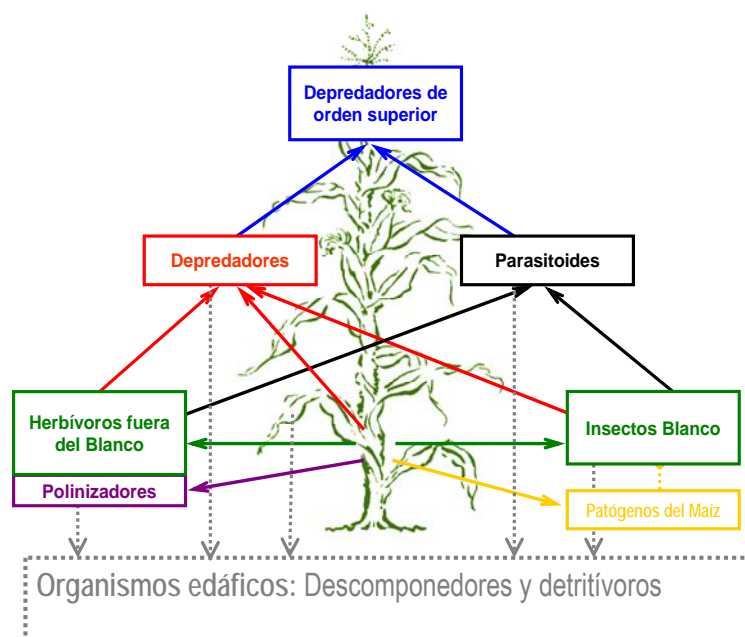
Existen algunos datos de riqueza específica en la región. En Venezuela se han elaborado listas de insectos fitófagos asociados al maíz que cuentan mas de 20 especies de artrópodos de las cuales 6 son lepidópteros, además de unos 6 nemátodos (Clavijo & Pérez Greiner, 2000). En Brasil se cuentan más de 20 especies de lepidópteros que se alimentan de maíz ya sea exclusiva o alternativamente (Sánchez-Soto & Nakano, 2003). Los relevamientos realizados en Argentina son de difícil acceso al tratarse en su mayoría de boletines técnicos de escasa circulación, elaborados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). No se han realizado hasta ahora relevamientos directos de la entomofauna asociada al maíz en el país, pero dos investigaciones se encuentran en curso sobre cultivares Bt (Bayce com. pers.; Zerbino com. pers.). A partir de la información sobre hospederos disponible en la bibliografía se pueden identificar entre 7 y 9 especies de lepidópteros directamente vinculadas al maíz y unas 10 más que tienen como hospederos gramíneas en general (Biezanko *et al.*, 1957; 1974; Bentancourt & Scatoni, 1989, 2003; Zerbino & Fassio, 1995). Si a estos datos les sumamos las especies de depredadores y parasitoides, los depredadores de mayor orden como reptiles, aves y roedores y los organismos edáficos comprendemos la complejidad de un abordaje total.

El único relevamiento comparativo de comunidades de insectos en cultivares de MON810 y variedades isogénicas en la región basado en riqueza específica no encontró variaciones significativas entre éstos si bien los números totales fueron siempre menores para el primero (Frizzas, 2003). El tamaño total del área relevada para cada tratamiento en algunos casos era menor a 1ha y las réplicas se realizaron sobre parcelas permanentes y con un gran esfuerzo de muestreo (alta pseudo replicación) lo que obliga a considerar estos datos con cautela.

Las redes tróficas están constituidas por complejas relaciones entre los organismos que componen un ecosistema y son parte vital del proceso de transferencia de materia y energía de los mismos (Margalef, 1993; Ricklefs & Schluter, 1993).

La **Fig. 3** ilustra los principales componentes de una red trófica asociada al maíz. En las siguientes secciones se detallarán los aspectos más relevantes que una evaluación de riesgos ambientales (ERA) fuera del blanco debe considerar para cada uno de los niveles de esta red.

Figura 3: Principales gremios de una red trófica asociada al maíz



Existe una creciente preocupación por parte de la comunidad científica internacional para estandarizar la metodología de evaluación de riesgos en especies fuera del blanco (Marvier, 2001; Lövei & Arpaia, 2005; López *et al.*, 2005; Andow & Zwahlen, 2006; Andow & Hilbeck, 2004). La definición de un protocolo estandarizado de muestreo que permita una minimización del ruido y la evaluación de diferencias sutiles a un alto grado de resolución estadística, conjuntamente con criterios consensuados para la elaboración de diseños experimentales es uno de los aspectos más importantes a considerar si se pretende generar resultados confiables y comparables.

6.2. Consumidores primarios

6.2.1. Herbívoros

Este grupo comprende a todos los animales que se alimentan de partes verdes, granos o raíces del maíz.

La exposición con la toxina *Cry* se puede dar por tres vías:

- (1) Ingeriendo partes de la planta
- (2) Ingeriendo polen
- (3) Ingeriendo agua del suelo

Los herbívoros que se alimentan de partes verdes o de espigas y cuya susceptibilidad a la toxina es baja podrían aumentar su nivel de daño, convirtiéndose en nuevas plagas. Al desaparecer la competencia que suponen las especies blanco, la liberación de este nicho y el levantamiento de la

exclusión competitiva podría llevar a nuevas especies a colonizar la planta o a incrementar el uso de este recurso (Strong *et al*, 1984; Bernays & Chapman, 1994; Jolivet, 1996). Esta posibilidad aumenta con el tiempo y la extensión del área ocupada por el CRI-Bt. A nivel empírico se han constatado modificaciones en frecuencias de daño entre diferentes especies blanco debido a una respuesta diferencial a las toxinas (Buntin, Flanders & Lynch, 2004).

En nuestro país conviven con las 3 especies plaga mencionadas anteriormente unas 15 especies de insectos que generan algún grado de daño sobre el maíz (Bentancourt & Scatoni, 2003), las cuales se hallan resumidas en la **Tabla 4**. De estas especies, 3 son lepidópteros. Sólo se han encontrado estimaciones de LC₅₀ para la “lagarta de la espiga” *Helicoverpa zea*. La misma es variable y se encuentra entre los valores registrados para *O.nubilalis* y *S.frugiperda* (ver **Tabla 3**).

Tabla 4: Principales insectos que se alimentan de maíz en el Uruguay.

Orden	Especie	Sem ¹	Pla	Rai	Tal	Cog	Hoj	Esp	Pan	Gra
Coleoptera	<i>Conoderus spp.</i>									
	<i>Cyclocephala signaticollis</i>									
	<i>Diabrotica speciosa</i>									
Diptera	<i>Delia platura</i>									
Hemiptera: homoptera ²	<i>Delphacodes spp</i>									
	<i>Empoasca curveola</i>									
	<i>Rhopalosiphum maidis</i>									
	<i>Schizaphis graminum</i>									
Hymenoptera	<i>Acromyrmex heyeri</i>									
	<i>Acromyrmex lundii</i>									
Lepidoptera	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>									
	<i>Helicoverpa zea</i>									
	<i>Peridroma saucia</i>									
	<i>Sitotroga cerealella</i>									

1 Sem: semillas; Pla: plántulas; Rai: raíces; Tal: tallos; Cog: cogollos; Hojas: hojas; Esp: espiga; Pan: panoja; Gra: granos almacenados.

2 Los homópteros son succionadores, la columna refiere al lugar de la planta donde se encuentran.

Adaptado de Bentancourt & Scatoni, 2003

El grupo de insectos no susceptibles que provocan daños económicos aun más importantes que los propios blancos, son las hormigas cortadoras (Formicidae: Attini). Estos insectos de distribución neotropical defoliar vegetación para alimentar un hongo con el que viven en relación mutual. No se reportan estudios sobre el impacto de los cultivos Bt sobre los géneros nativos de hormigas cortadoras (géneros *Atta* y *Acromyrmex*). Los himenópteros son poco susceptibles a las toxinas Cry del subgrupo I (Bauer, 1995). Una ERA debería considerar posibles interacciones de la toxina con el hongo mutual, así como el signo de dicha interacción. Tampoco deberían descartarse efectos en otros organismos asociados a los hormigueros (parásitos, comensales, etc.). Aparte de su rol perjudicial, las hormigas cortadoras juegan un papel importante en el reciclaje de biomasa, especialmente en las comunidades de pradera de América del Sur. Finalmente, se deberían realizar estudios comparativos de la intensidad de forrajeo de las hormigas en cultivos Bt y en variedades no Bt. No se han realizado mayormente estudios de evaluación de riesgos fuera del blanco en hormigas ni en insectos sociales en general, a pesar de ser integrantes relevantes de los agroecosistemas (Lövei & Arpaia, 2005).

La ingesta de polen extiende el riesgo de exposición a los organismos que habitan la flora adyacente a los cultivos de maíz, por ingesta accidental de los granos depositados sobre las plantas hospederas. La preocupación sobre este grupo de herbívoros surgió a partir de una comunicación de Losey *et al.* (1999) publicada en la revista *Nature*, que daba cuenta de una disminución significativa en las tasas de alimentación, crecimiento y mortalidad de orugas de mariposa "Monarca" *Danaus plexxipus* L. al ser alimentadas con hojas de *Asclepias curassavica* (su planta hospedera) cubiertas de polen proveniente de maíz Bt 176. La importancia cultural y turística que esta especie de mariposa tiene en Norteamérica convirtió esta publicación en un argumento de peso en el discurso de muchas ONG's ambientalistas. Si bien recibió una serie de críticas por los organismos gubernamentales (EPA, 2001; Sears *et al.*, 2000) y fue cuestionado en contribuciones posteriores (Wraight *et al.*, 2000; Pimentel & Raven, 2000; Sears *et al.*, 2001) en cuanto al alcance y la validez de las conclusiones presentadas para las condiciones experimentales en las que fue desarrollado, dejó en evidencia la complejidad de las interacciones que los OVM podían establecer en el ambiente y la consecuente sutileza de los riesgos potenciales. Los resultados de las investigaciones posteriores han sido variables en cuanto a los niveles y las condiciones en las que ese riesgo puede manifestarse.

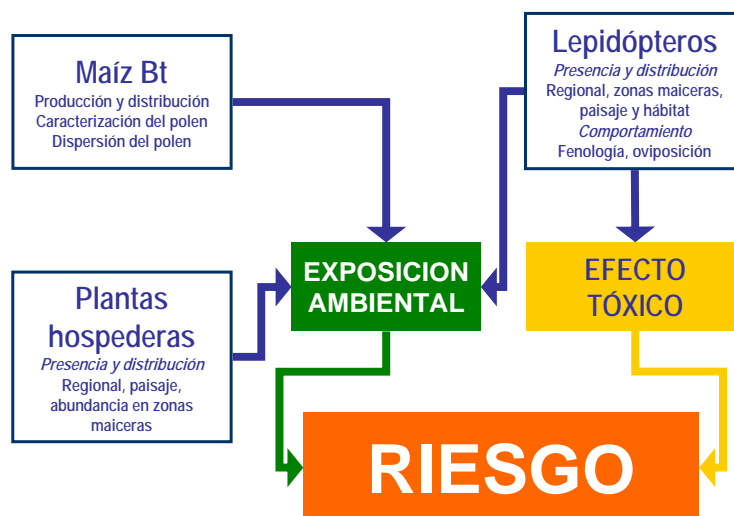
Como fue anteriormente mencionado, las mediciones de *Cry/Ab* realizadas sobre el mismo evento en diferentes estudios han demostrado una gran variabilidad (Abel & Adamczyk, 2004; Zwahlen *et al.*, 2003b). **Es necesario conocer los valores de toxina que expresan los cultivos en nuestras condiciones. También es necesaria la realización de ensayos de deposición de polen ajustados para nuestras condiciones de viento y la estructura de las plantas adyacentes a los cultivos.**

Dentro de nuestras comunidades vegetales linderas a los cultivos de maíz, la asociación vegetal conocida como chirca (Sganga, 1994) debería ser uno de los hábitats sobre el cual iniciar los estudios. En ella se encuentran algunas especies vegetales que son hospederas de un gran número de lepidópteros nativos: compuestas, umbelíferas, solanáceas, etc. Un número importante de mariposas de la subfamilia *Danainae*, a la cual pertenece la monarca son frecuentes en esta asociación. La **Fig. 4** presenta los componentes de una Evaluación de Riesgos de organismos fuera del blanco que habitan en zonas adyacentes a los cultivos.

El riesgo de intoxicación para los fitófagos que se alimentan de jugos o néctar no se presume significativo, debido a las bajas concentraciones de las toxinas *Cry* en estos sectores de la planta. No obstante, algunas de estas poblaciones también podrían verse afectadas por los cambios en las poblaciones de los insectos susceptibles (Raps *et al.*, 2001).

Existen especies de lepidópteros que se alimentan de los granos almacenados, la mayoría de ellas cosmopolitas y polífagas. Algunas de ellas presentan resistencia a las toxinas Bt como es el caso mencionado de *Plodia interpunctella*. Sería importante evaluar si existen efectos negativos para el complejo de enemigos naturales que controlan las poblaciones de estos insectos en los silos, especialmente en el complejo de parasitoides tal como se discutirá en las próximas secciones.

Figura 4: Componentes de una ER del impacto del polen de maíz Bt en las poblaciones de fitófagos asociados a ecosistemas maiceros



Adaptado de Sears *et al.* (2001).

6.2.2. Polinizadores

No se ha detectado intoxicación debida a la exposición a maíz Bt en *Apis mellifera* L. (Malone & Pham-Delègue, 2001). Ni las larvas ni los adultos son afectados por la ingesta de polen de maíz Bt de diversos eventos, habiéndose detectado, por el contrario, toxicidad en el lepidóptero parásito *Galleria melonella* L. (Hanley *et al.*, 2003). No existe información sobre nuestros polinizadores nativos.

Los polinizadores representan un desafío al aislamiento de los cultivos Bt, ya que actúan como vectores de dispersión del polen. Si en el contexto de un proyecto productivo para el país se planteara la coexistencia de sistemas de producción basados en OVM con proyectos agroecológicos (huerta orgánica, apicultura orgánica), sería necesario delimitar las áreas efectivas de forrajeo (*home range*) de las especies de polinizadores, para poder determinar el riesgo de flujo genético desde las plantas transgénicas a variedades no Bt y establecer áreas efectivas de exclusión. La posibilidad real de coexistencia de ambos regímenes de explotación agrícola es un punto necesario en la discusión hacia la elaboración de un marco nacional de bioseguridad. Dicha posibilidad ha sido puesta en tela de juicio en los últimos años y con miradas ciertamente críticas en los últimos años (Altieri, 2003, 2005).

6.2.3. Patógenos del maíz

En Estados Unidos, donde la principal plaga es *O. nubilalis*, se ha registrado una disminución de las micotoxinas de la familia de las fumonisinias en las plantas Bt, como consecuencia del menor número de plantas afectadas por el barrenador, que actúa como vector para la diseminación de propágulos de los hongos patógenos (Munkvold *et al.*, 1999). No se ha estudiado si este fenómeno se verifica para nuestras especies (en Uruguay el principal vector es *D. saccharalis*) pero algunas evidencias apuntan en esa dirección (Casella, 2004).

Debería estudiarse la interacción de los cultivos de maíz con la explotación de Soja RR. Se ha comprobado que estos cultivos promueven un aumento en las poblaciones de *Fusarium* spp. (Dunfield & Germida, 2004), uno de los géneros de hongos productores de micotoxinas más importantes para nuestro país.

6.3. Consumidores secundarios

Al pasar de las interacciones bitróficas (planta – consumidor primario) a las tritróficas (planta – consumidor primario – consumidor secundario), las vías de exposición se vuelven mucho más sutiles y complejas, dificultándose su elucidación (Andow & Hilbeck, 2004).

Una revisión exhaustiva sobre los estudios realizados para estimar impactos de los cultivos Bt sobre enemigos naturales ha sido realizada por Lövei & Arpaia (2005). En dicho trabajo los autores remarcan la importante influencia de los diseños experimentales y de muestreo e insisten en la necesidad de estandarizar los mismos y establecer criterios claros que permitan un mejor análisis comparativo de los datos obtenidos. Algunas publicaciones ya exigen un cierto número de réplicas o niveles de incertidumbre para los estudios a presentar (Andow & Zwahlen, 2006).

Los efectos producidos por los CRI-Bt sobre los enemigos naturales son específicos para cada taxón y están relacionados con la arquitectura de las redes tróficas. En un país donde la mayoría de los órdenes de insectos no ha sido debidamente estudiada y no se posee un nivel de resolución taxonómica por debajo del nivel de familia es muy difícil evaluar este tipo de riesgos por falta de información.

Un consumidor secundario (depredador o parasitoide) podría ser afectado por los CRI-Bt de diversas maneras:

- Directamente:
 - responde a las toxinas Bt contenidas en la presa/hospedero
 - ingiere partes de la planta
 - sufre las consecuencias de dosis subletales en la presa/hospedero (atacando individuos con menor peso o calidad nutricional).
- Indirectamente:
 - los cambios en la población de la presa/hospedero afectan su propia dinámica poblacional y/o comportamiento con consecuencias sobre su densidad, distribución espacial, flujo génico, etc.

6.3.1. Depredadores

Un depredador es un consumidor secundario que se alimenta de presas vivas (generalmente de menor tamaño) a las que caza y mata, consumiéndolas en un periodo relativamente corto de tiempo. Existen diversos grados de especificidad pero la mayoría de los depredadores son generalistas, consumiendo presas dentro de un amplio margen de taxa. Desde la perspectiva de los agroecosistemas, los depredadores son importantes para el control biológico natural de las especies plaga (Bentancourt & Scatoni, 2001).

Los principales riesgos de los CRI-Bt se relacionan con el consumo de presas que contienen la toxina en sus tejidos, el consumo de plantas o la reducción en la eficacia biológica de los depredadores por alimentarse de presas de menor tamaño o calidad nutricional. Otros riesgos más difíciles de caracterizar incluyen alteraciones en los parámetros poblacionales de los depredadores debidos a cambios en la oferta de presas o a modificaciones del paisaje por el manejo de los cultivos.

En lo que refiere a intoxicación por *Cry* es potencialmente más peligroso para los depredadores consumir insectos no susceptibles. En los insectos blanco la toxina ingerida se une a receptores en el mesenterón (intestino medio) y sufre una reestructuración que implica la pérdida de toxicidad (Masson *et al*, 1999). En insectos fuera del blanco no susceptibles a la toxina, ésta permanece en el cuerpo del insecto manteniendo su toxicidad (Groot & Dicke, 2002).

Algunos depredadores pueden alimentarse de polen u hojas si la presa disminuye su densidad (Groot & Dicke, 2002). En este caso el riesgo de intoxicación aumenta en las zonas del cultivo transgénico, donde la densidad de la presa es baja.

En un metanálisis que involucra la recopilación de más de 100 parámetros cuantificados en laboratorio para diferentes depredadores y en diferentes condiciones Lövei & Arpaia (2005) encontraron un 30% de trabajos que reportan cambios negativos significativos ($p < 0,05$) contra un 47, 5% de estudios que no encuentran cambios ($p=0,5$). El nivel de afectación difiere no sólo según el diseño experimental y de muestreo sino también según el grupo zoológico en consideración.

La toxina se acumula en los tejidos de varios depredadores (Harwood *et al.*, 2005) entre los que se cuentan hemípteros pertenecientes a las familias Nabidae y Anthocoridae, coleópteros de las familias Chrysomelidae, Coccinellidae, Carabidae y Scarabeidae y arañas.

Los hemípteros ingieren la toxina porque complementan la dieta de presas alimentándose muchas veces de polen.

Dentro de los antocóridos el género *Orius* se encuentra presente en nuestro país siendo la especie más común *Orius insidiosus* (Say) (Bentancourt & Scatoni, 2001). Estos animales también complementan su dieta consumiendo plantas además de presas, con lo que concentran altas cantidades de toxina en sus tejidos (Harwood *et al.*, 2005). Esta especie ha sido estudiada en profundidad debido a su importancia como controlador natural de *O.nubilalis*. Sin embargo, no se han encontrado efectos negativos en su supervivencia ni en sus parámetros poblacionales (Al-Deeb *et al.*, 2001; Harwood *et al.*, 2005; Pilcher *et al.*, 2005).

Las diversas familias de arañas que habitan en altas densidades en nuestros agroecosistemas constituyen un grupo de depredadores generalistas que contribuyen al control de las poblaciones de insectos perjudiciales (Bentancourt & Scatoni, 2001). Muchas arañas consumen hemípteros y otros depredadores aumentando considerablemente las concentraciones de toxina en sus tejidos (Harwood *et al.*, 2005).

Los nábidos son abundantes en nuestro país en los cultivos de cereales e importantes controladores de varios lepidópteros (Bentancourt & Scatoni, 2001). También complementan su dieta con la ingesta de polen, pero no se han realizado estudios sobre el impacto de los CRI-Bt sobre este grupo.

En lo que respecta a los coleópteros, la ingesta de toxina se da mayoritariamente por el consumo de presas. Las toxinas Cry del grupo I son inocuas para los coleópteros (Bauer, 1995; Polanczyk & Alves, 2003). Se requieren estudios de efectos indirectos debidos al consumo de presas de inferior calidad. Su carácter de grupo megadiverso, ocupando prácticamente todos los niveles tróficos convierte a los coleópteros en candidatos para un estudio de riesgos en maíz Bt. Ya se ha evaluado este potencial para los carábidos, buscando especies que permitan estimaciones estadísticamente fiables (López *et al.*, 2005). Dentro de esta familia se ubican las larvas carnívoras del género *Calosoma*, que son controladoras de varias especies de lepidópteros plaga y entre ellos de *S.frugiperda* (Bentancourt & Scatoni, 2001).

Hacia fines de la década del 90 una serie experiencias de laboratorio demostraron un aumento significativo en la mortalidad y una reducción del crecimiento en neurópteros de la especie *Chrysoperla carnea* al ser alimentada con presas que habían consumido dietas con toxina CryIAb o plantas Bt (Hilbeck *et al.*, 1998a, 1998b, 1999). Estos datos provocaron preocupación en la comunidad científica porque los neurópteros están filogenéticamente más cerca de los coleópteros que de los lepidópteros, por lo que no se suponía que pudieran ser susceptibles a las toxinas Cry del grupo I. Además los crisópidos son organismos importantes para el control de insectos

perjudiciales en los agroecosistemas. Estudios posteriores no han encontrado diferencias en la abundancia *in situ* de *C. carnea* en cultivos Bt y no Bt (Pilcher *et al.*, 2005). Los autores reclaman más estudios sobre la exposición de esta especie a la toxina en condiciones de campo. Los adultos también complementan su dieta con polen y de hecho son atraídos a los maizales durante la antesis (Pilcher, *et al.*, 2005).

La diversidad de los neurópteros del Uruguay ha sido escasamente estudiada (Bentancourt & Scatoni, 2001). La especie más común dentro de la familia Chrysopidae es *Chrysoperla externa* Hagen, un importante controlador en diversos cultivos.

Otro grupo importante de depredadores lo constituyen los ácaros de la familia Phytoseiidae, los cuales son usados desde hace algunos años como agentes de control biológico para ácaros fitófagos (Groot & Dicke, 2002). Existe un trabajo que da cuenta de toxicidad en el ácaro depredador *Metaseiulus occidentalis*, pero se basa en el rociado con Btk no proveniente de una planta (Chapman & Hoy, 1991).

En resumen, existen escasas evidencias de intoxicación aguda para la mayoría de los depredadores, exceptuando neurópteros. No obstante los depredadores se exponen a concentraciones variables de las toxinas acumuladas en los tejidos de sus presas. En lo que concierne a este grupo, una ERA debería estimar las consecuencias de la exposición crónica sobre la eficacia biológica de los individuos (Andow & Zwahlen, 2006). El único estudio que existe sobre efectos de la exposición crónica encontró una disminución significativa de la masa corporal (Zwahlen *et al.*, 2003a). Este estudio, realizado para la lombriz de tierra *Lumbricus terrestris* L. será comentado más adelante.

No debería soslayarse que un cambio en la dinámica de las interacciones tróficas a estos niveles podría afectar a depredadores de orden superior como los quirópteros o aves. Los vertebrados no son sensibles a las toxinas *Cry* incluso en concentraciones varios órdenes de magnitud por encima de las ambientales (EPA, 2001). Cabe preguntarse si los cultivos Bt se están convirtiendo en “desiertos ecológicos” para estos animales, afectando su selección de hábitat (Obrycki *et al.* 2001).

6.3.2. Parasitoides

Pertencen a este grupo insectos en su mayoría representantes de los órdenes Hymenoptera y Diptera que realizan parte de su ciclo vital parasitando los huevos, larvas o pupas de insectos específicos, a los cuales finalmente matan (Bentancourt & Scatoni, 2001). Los parasitoides se caracterizan por una especificidad mucho mayor que los depredadores y una sincronización de los ciclos vitales con sus hospederos, convirtiéndose en agentes importantes de control biológico (Godfray, 1994).

Existe un mayor consenso en lo que refiere a los impactos negativos de los CRI-Bt sobre las poblaciones de parasitoides, consenso que se basa en un mayor número de evidencias. En el estudio de Lövei & Arpaia (2005) referido anteriormente, 57% de los estudios realizados para CRI-Bt reportan diferencias negativas significativas.

La intoxicación de los parasitoides por consumo de partes de la planta es improbable. En general los adultos de estas especies no se alimentan o lo hacen de néctar, el cual contiene cantidades muy bajas de toxinas *Cry* como ya se mencionara.

Se reporta disminución de la supervivencia en parasitoides creciendo en herbívoros alimentados con toxinas *Cry* en una serie de estudios (Groot & Dicke, 2002; Lövei & Arpaia, 2005).

Por otra parte, se registran diferencias significativas en la abundancia de parasitoides entre cultivos Bt y sus pares isogénicos (Pilcher *et al.*, 2005). Uno de los estímulos que guían a los

parasitoides en el campo son los compuestos volátiles emitidos por las plantas en respuesta al ataque de herbívoros hospederos (Shiojiri *et al.*, 2002; Lo Pinto *et al.*, 2004). Como se registran menores tasas de daño en los CRI-Bt la concentración de estos volátiles disminuye en los cultivos pero además se registran diferencias cualitativas en la composición de los volátiles (Dean & De Moraes, 2006). Esto lleva a la emigración de los enemigos naturales hacia ambientes con mayor número de señales (Johnson, 1997). Consecuentemente, las tasas de parasitismo también disminuyen en los cultivos Bt. Este fenómeno ha sido observado también en nuestro país, con un aumento muy marcado de las poblaciones de parasitoides en los refugios (Bayce, com. pers.).

El establecimiento de poblaciones de alta densidad de parasitoides en los refugios, rodeados de bajas densidades en el área Bt nos plantea un nuevo escenario ecológico. ¿Cómo estará afectando esta distribución espacial altamente parcheada al flujo génico de las poblaciones de parasitoides? ¿Existe probabilidad de aislamiento geográfico de las poblaciones de parasitoides en los refugios? Si es así, ¿cómo afecta este aislamiento a la supervivencia de las poblaciones? Y, finalmente: ¿Cómo se puede manejar la estrategia de refugios para minimizar consecuencias negativas?

El impacto de las estrategias de MRI sobre especies fuera del blanco debería ser considerado en una ERA, aunque esta preocupación recién comienza a manifestarse en la comunidad científica (Bates *et al.*, 2005).

El control biológico natural por parte de los enemigos naturales es un factor importante en el mantenimiento de las poblaciones blanco (Ribeiro, 2000). Las especies de lepidópteros del maíz son controladas por un número importante de parasitoides (14 en *S.frugiperda* y 9 en *D. saccharalis*) (Bentancourt & Scatoni, 2001; Basso & Morey, 1990) por lo que una evaluación de riesgos debería considerar muy especialmente este complejo de especies.

6.4. Organismos edáficos

Dentro de esta categoría se incluyen todos los organismos habitantes del suelo: los microorganismos descomponedores de la rizosfera, algas, hongos y la fauna detritívora, compuesta principalmente de artrópodos, nemátodos y anélidos.

Se utiliza el término rizosfera para referirse al “volumen de interacción entre el sistema radical de los vegetales y su inmediato medio suelo” (Frioni, 1999). Comprende todo el volumen de suelo en contacto con las raíces. En esta zona se da la mayor interacción entre microorganismos y vegetales y está caracterizada por un marcado aumento en las poblaciones de microorganismos, en comparación con el suelo circundante (Frioni, 1999; Motavalli *et al.*, 2004). Si bien el crecimiento y comportamiento de los vegetales en condiciones naturales depende fundamentalmente de factores edáficos y ambientales, es afectado en forma significativa por los organismos que colonizan su rizosfera (Dunfield & Germida, 2004; Fang *et al.*, 2005).

El aumento en la productividad de este micro ecosistema se complementa con una rica fauna de invertebrados, en su mayoría detritívoros, cuya actividad es importante para el mantenimiento de las cualidades fisicoquímicas del suelo. La biota asociada al suelo es fundamental para el flujo de materia y energía en los ecosistemas. Es responsable de una serie de procesos fisicoquímicos: la descomposición de materia orgánica, la mineralización de nutrientes y la fijación de nitrógeno atmosférico, entre otros.

El riesgo potencial de los CRI-Bt sobre estos organismos fue originalmente señalado por Snow & Morán-Palma (1997) aunque en ese trabajo se minimizaba su efecto, debido a que las toxinas *Cry* se hallan naturalmente presentes en el suelo y porque se estimaba una vida media relativamente corta. En los últimos 5 años, una serie de trabajos ha cuestionado estos dos supuestos.

La concentración de toxinas *Cry* ha aumentado más de 2500 veces su concentración en los suelos cultivados con CRI-Bt (EPA, 2001; Blackwood & Buyer, 2004) con respecto a iguales suelos sin estos vegetales.

Por otra parte, existen evidencias de que los exudados de la raíz de plantas Bt (tanto Bt11 como MON810) contienen concentraciones tóxicas de *CryIAb* (Saxena *et al.*, 1999, 2002) que retienen su actividad insecticida hasta por 300 días. También se libera la toxina en el suelo a partir de los rastrojos (Zwahlen *et al.* 2003b) de plantas Bt.

La toxina puede resistir aun la digestión ruminal, habiéndose encontrado en los jugos gástricos de vacunos e inclusive en sus heces (Einspanier *et al.*, 2004).

6.4.1. Microorganismos

Han sido detectadas diferencias significativas en la composición y actividad de las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera entre cultivos Bt y sus isogénicos más cercanos. Dunfield & Germida (2004) resumen los resultados más relevantes en la materia. Los cambios probablemente se asocian con una respuesta diferencial de las distintas especies o gremios tróficos a los nuevos compuestos liberados en el suelo. Sin embargo los efectos varían según el tipo de suelo, la época del año y el método de análisis (Dunfield & Germida, 2004; Fang, *et al.*, 2005).

La principal variable determinante de la composición y estructura de las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera en cultivos de maíz es el tipo de suelo (Blackwood & Buyer, 2004; Fang *et al.*, 2005). No se han detectado diferencias significativas en la abundancia, asociados a la presencia de CRI-Bt, en aquellos microorganismos abundantes y frecuentes pero sí son afectadas otras especies, muchas de las cuales no pueden ser cultivadas en laboratorio y de las que se posee escasa información.

Al discriminar las comparaciones para cada tipo de suelo Blackwood & Buyer (2004) encontraron una disminución significativa del perfil fisiológico de la comunidad (*Community-Level Physiological Profiling*) en suelos con mayor contenido de arcilla. Esta evidencia se suma a los trabajos de Saxena y colaboradores, que demuestran un mantenimiento de la actividad de las toxinas Cry al ser retenidas por arcillas en el suelo (Saxena *et al.*, 1999, 2002). **Un ordenamiento territorial de los cultivos Bt debería tener en cuenta esta variable para decidir la implementación o no de esta tecnología en diferentes regiones del país.**

Existen otras diferencias entre el cultivo Bt y su isogénico no OVM que podrían afectar el desempeño de los microorganismos del suelo.

El menor daño de los cultivos Bt produce una mayor biomasa muerta disponible y un cambio en la composición de los residuos (Motavalli *et al.*, 2004). Esto, sumado a la mayor presencia de lignina en el maíz Bt, hasta un 96% más que en sus isogénicos no Bt más cercanos (Saxena & Stotzky, 2001b) podría retardar la descomposición de residuos.

6.4.2. Invertebrados

Conviviendo con los microorganismos existe un importante número de habitantes del suelo que incluye entre otros microartrópodos, larvas y pupas de insectos superiores, ácaros, anélidos, moluscos y nemátodos. Dentro de este grupo heterogéneo de organismos algunos cumplen importantes funciones como detritívoros. Los detritívoros procesan la biomasa muerta como paso previo para su utilización por los microorganismos descomponedores (Margalef, 1993). Muchos de estos detritívoros son importantes agentes de mezcla y compactación del humus con los minerales del suelo.

Los trabajos sobre el efecto de los CRI-Bt en este gremio son muy recientes. Blackwood & Buyer (2004) encontraron una reducción significativa de los perfiles de fosfolípidos (*PhosphoLipid Fatty Acid Profiles*) en algunos suelos compactados cultivados con maíz Bt, lo cual podría sugerir una disminución significativa de las poblaciones de microartrópodos, mediada por la presencia de CryIAb.

Algunas ONG's internacionales reportan toxicidad de ciertas variedades Bt para insectos edáficos, específicamente *Collembola spp.* (Greenpeace, 1999). Un informe de la Environmental Protection Agency (Estados Unidos), al cual probablemente refiere el documento de Greenpeace, encontró efectos negativos en algunas especies de colémbolos (*Folsomia candida*) que se manifestaron en un aumento de la mortalidad y una reducción de la reproducción de estos animales (EPA, 2001) si bien se descartó para el evento MON810. En este mismo informe se descarta toxicidad en condiciones de campo para las lombrices y nemátodos. El estudio del que se hace referencia no explicita las condiciones en las que se hizo el experimento ni es suficientemente claro en sus resultados. Otros estudios no hallaron toxicidad en nemátodos o lombrices en 45 días (Saxena & Stotzky, 2001a) o incluso en colémbolos (Gamundi *et al.*, 2002).

Como se ha señalado en las anteriores secciones, la duración de los estudios puede determinar los resultados. En este gremio es particularmente importante, ya que muchos detritívoros tienen ciclos generacionales más largos que los artrópodos (Marvier, 2001). Zwahlen *et al.* (2003a) encontraron diferencias significativas en el peso de lombrices adultas (*Lombricus terrestris*) alimentadas en el laboratorio sólo a partir de los 200 días de alimentación.

En un estudio de preferencias de consumo del "bicho bolita" *Porcellio scaber* ante una oferta de híbridos Bt y no Bt, se encontró una alimentación significativamente menor sobre hojas de maíz Bt11 (Wandeler *et al.*, 2002). En dicho estudio se detectó además la toxina CryIAb en las heces y en los tejidos del animal, indicando que parte de la toxina no es eliminada.

En resumen, el estudio de los efectos adversos a nivel de la biota edáfica y las categorías tróficas que la componen se encuentra todavía en un estadio temprano. La naturaleza aparentemente crónica y acumulativa de este fenómeno y la disparidad de resultados obtenidos al momento obligan a realizar un seguimiento a largo plazo en este sector del ecosistema.

6.5. Abordaje metodológico

Debido a la naturaleza reciente de los OVM liberados al ambiente, la comunidad científica aún no ha estandarizado los procedimientos para una evaluación de riesgos ambientales fuera del blanco.

Uno de los abordajes más utilizados es el ecotoxicológico. El principal objetivo de este tipo de enfoque es determinar intoxicación aguda, utilizando especies indicadoras. Los pasos a seguir son:

- (1) Elección de especies indicadoras;
- (2) identificación de las puertas de entrada de la toxina en el ambiente;
- (3) cuantificación de dosis letales y subletales para las especies indicadoras, realizada en laboratorio usualmente a partir de la toxina depurada incorporada en dietas artificiales y
- (4) cruzamiento de la información anterior con la distribución espacial y la fenología de las especies indicadoras.

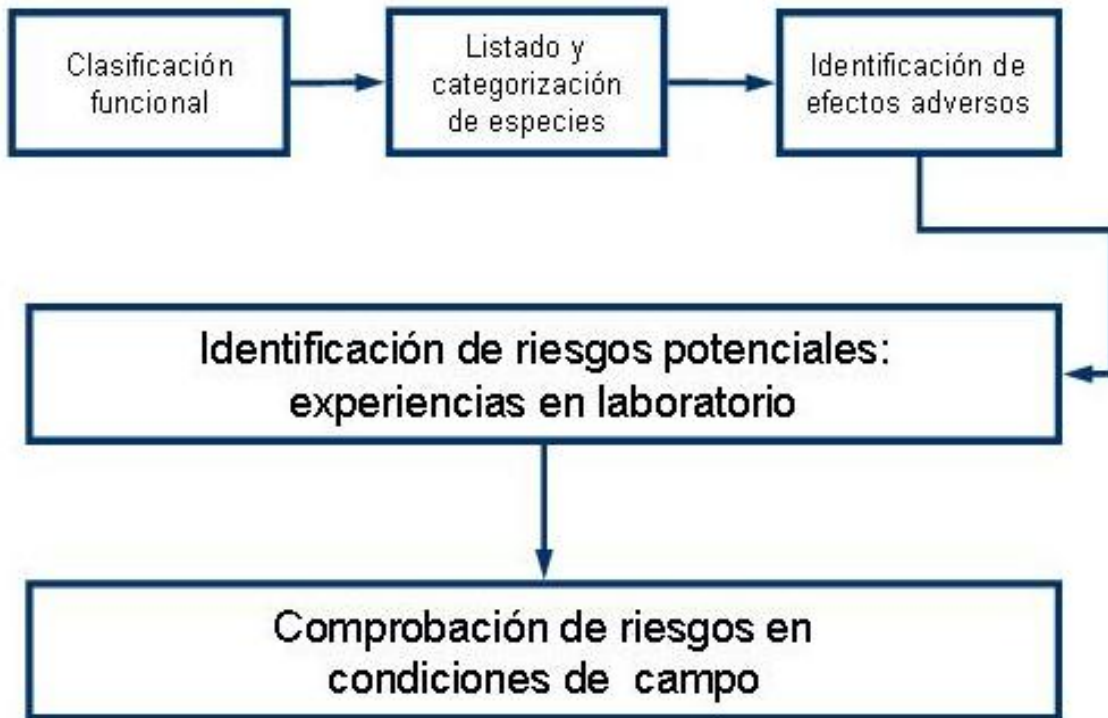
En el contexto de los OVM vegetales cultivados, este modelo presenta algunas desventajas. El análisis ecotoxicológico considera datos de intoxicación aguda, con lo cual no contempla necesariamente los tiempos en los que operan los procesos poblacionales y comunitarios ni los flujos de materia y energía en el ecosistema. Pueden existir efectos subletales que disminuyan la eficacia biológica o *fitness* de las especies y que pasen desapercibidos en este tipo de abordaje (Andow & Hilbeck, 2004). El criterio de selección de especies se basa en su ubicuidad y facilidad de muestreo y cría en laboratorio, por lo que tampoco es útil para detectar efectos a nivel de las redes tróficas. Finalmente, el uso de dietas artificiales o de toxinas depuradas no considera las interacciones químicas que ocurren dentro del OVM, que pueden a su vez modificar los perfiles químicos que los sustituyen. No obstante lo antedicho, este abordaje presenta características relevantes para la evaluación de OVM como la medición de incertidumbre o el escalonamiento, sobre los cuales se hará referencia más adelante.

Otro abordaje es el modelo de especies invasoras. En este contexto, un OVM es tratado con un análisis similar al de las especies exóticas introducidas intencional o accidentalmente en un ecosistema. Es una fuerte recomendación de la comunidad científica internacional tratar el fenómeno de las especies invasoras y el de los OVM en forma conexas, unificando a nivel gubernamental las oficinas y el personal dedicado a los mismos (David Andow, com.pers.). Los protocolos de metodologías de análisis de riesgo de plagas (ARP) desarrolladas por FAO han recogido esta recomendación en la elaboración de la norma internacional NIMF11. La formulación actual de este modelo es, empero, demasiado burda para poder considerar la complejidad del fenómeno de los OVM y no prevé un tratamiento sistemático de la incertidumbre (Andow & Hilbeck, 2004).

En la última década, las crecientes evidencias de bioacumulación y biomagnificación de las toxinas Bt (Wandeler *et al.*, 2002, Zwahlen *et al.*, 2003b; Harwood *et al.*, 2005) y de efectos en otros niveles tróficos (Orr & Landis, 1997; Hilbeck *et al.*, 1998a, 1998b, 1999; Hanley *et al.*, 2003; Zwahlen *et al.*, 2003a) han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas de abordaje (Lövei & Arpaia, 2005; Andow & Zwahlen, 2006). Andow & Hilbeck (2004) elaboraron un modelo de análisis de riesgo de CRI-Bt para organismos fuera del blanco potencialmente presentes en agroecosistemas, a escala local. La comunidad total es dividida en diferentes nichos tróficos o gremios (*guilds*). Las especies en cada compartimento son calificadas en función de una serie de variables. Una vez caracterizada la exposición al OVM, las especies mejor calificadas son

evaluadas en el laboratorio, buscando alteraciones en su eficacia biológica causadas por la exposición al OVM. Los riesgos potenciales identificados son contrastados con datos de campo. Se recurre, a un diseño estadístico capaz de detectar diferencias sutiles entre tratamientos, a un alto nivel de resolución (**Fig. 5**). El refinamiento de dicho modelo se encuentra en consideración por la comunidad científica.

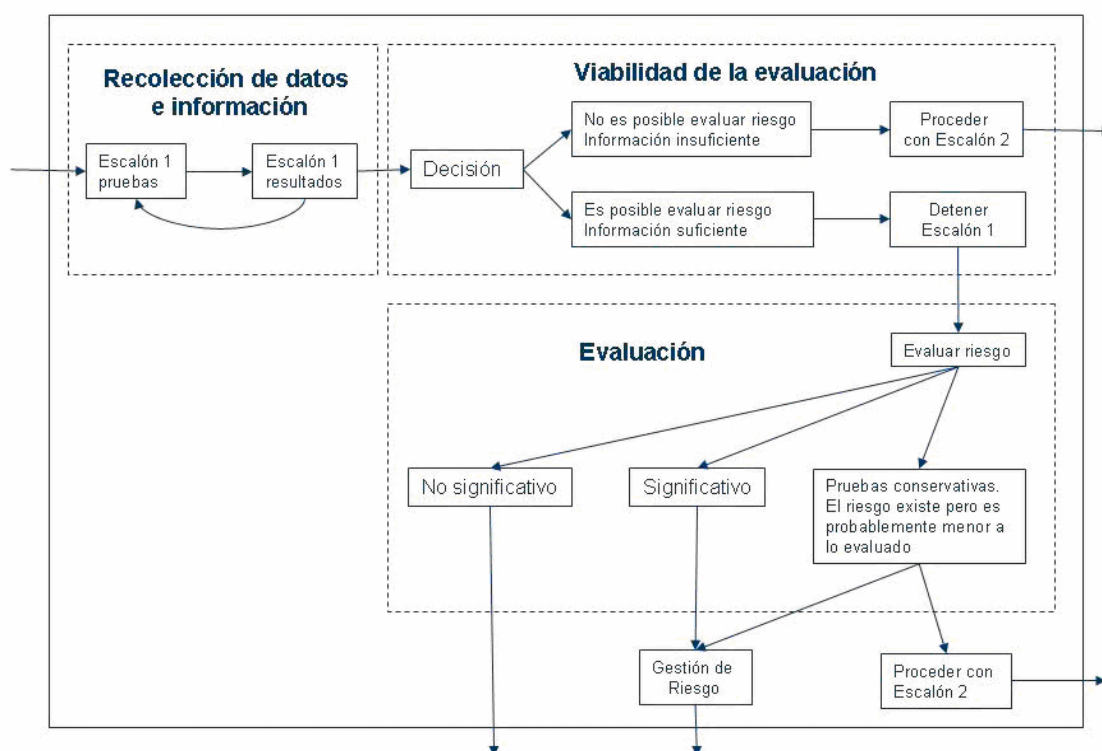
Figura 5: Etapas en una evaluación de riesgos ambientales (ERA) basada en criterios ecológicos.



Traducido y adaptado de Andow & Hilbeck (2004).

Otro factor que debe considerarse es la realización de evaluaciones en forma escalonada. El escalonamiento en una ERA implica la recolección de información y datos y un algoritmo de decisión que considera si los riesgos pueden ser evaluados con la información y datos disponibles o si se requiere información adicional (Andow & Zwahlen, 2006). Los procesos vinculados a cada escalón se incluyen en la **Fig. 6**.

Figura 6: Marco metodológico de una ERA escalonada. Se muestra la estructura de un escalón



Traducido de Andow & Zwahlen (2006).

El escalonamiento permite concentrarse en los riesgos potenciales más serios en primera instancia y economizar esfuerzos y presupuesto. Cada escalón del proceso debería poder determinar decisiones de gestión (Andow & Zwahlen, 2006).

Finalmente, una ERA requiere de pruebas estadísticas formuladas con un poder y criterio diferente al tradicional. En lo que refiere al poder estadístico de los experimentos, si es posible ajustar el factor de incertidumbre el experimento debería detectar diferencias de un 25 a 30 % a $p=0,05$. Si no se puede ajustar la incertidumbre el experimento debería detectar diferencias de un 10% a ese nivel de p . Los resultados que excedan esos mínimos deberían disparar nuevos experimentos (Andow & Zwahlen, 2006).

El modelo de inferencia usual en pruebas experimentales también debe ser revisado. En un experimento tradicional es importante que el diseño de las pruebas de significación permita minimizar el error de tipo I (rechazar la H_0 cuando ésta es verdadera). Es importante descartar falsos positivos en una prueba de medias, por ejemplo. En una ERA, las pruebas de inferencia estadística deben ser igualmente eficaces en minimizar el Error de tipo II (aceptar la hipótesis nula cuando es falsa). Evitar un falso negativo en un contexto precautorio es incluso más importante por las consecuencias que ello implica en una ERA: aceptar la falta de evidencia como ausencia de efectos adversos. En un enfoque precautorio “la ausencia de evidencia no es evidencia de ausencia” (Altman & Bland, 1995).

7. Conclusiones y recomendaciones

- El Análisis de Riesgos no ha sido conducido correctamente en ninguno de los procesos de aprobación de maíz transgénico en el Uruguay. Se recurrió a un panel de expertos (CERV) pero sus informes se limitaron a una interpretación de los materiales bibliográficos suministrados por los solicitantes. En lo que concierne a la Evaluación de Riesgos Ambientales, se realizó un esbozo de la formulación de problema y la fase de análisis se reduce a una investigación bibliográfica incompleta, sin que medie comprobación *in vitro* o *in situ* de los datos relevados. No se caracterizaron los riesgos ni se presentó un plan de manejo.
- El manejo de la incertidumbre no respetó el Principio de Precaución. De ser así debería haberse postergado la introducción de los eventos hasta tanto no se tuvieran datos de toxicidad de los eventos de maíz introducidos, sobre las especies propuestas como blanco.
- Se debe fortalecer el conocimiento en Análisis de Riesgo y especialmente en Evaluación de Riesgos Ambientales. La carencia en el segundo caso es profunda, afectando no sólo a la producción científica sino también al personal capacitado en la academia y en los organismos de contralor.
- En los aspectos metodológicos, se debería desarrollar un abordaje escalonado que permitiera tomar decisiones intermedias, a medida que se obtiene nueva información. Esto favorecería un adecuado uso de los recursos económicos. Asimismo, este enfoque metodológico podría habilitar la implementación de medidas de gestión en forma escalonada pero sin intervenir con la ERA.
- Deben establecerse con claridad las competencias y obligaciones que corresponden a los diferentes actores (proponentes, gobierno, sociedad civil, productores, ONG) en la implementación de los AR de OVM, incluyendo los aspectos de financiación de los estudios.
- Se debería discutir la conveniencia de realizar en forma previa a la liberación de un CRI-Bt un análisis de su eficacia en el control de nuestra matriz de plagas. La relevancia de tal estudio dependerá de la forma en la que el país asuma los costos de un eventual fracaso del paquete tecnológico implementado y constituye una herramienta de decisión política, conectada a la gestión pero separada de la ERA.
- No existe posibilidad de transferencia genética desde el maíz hacia especies silvestres en nuestro país, pero sí riesgo de contaminación de cultivos no Bt con polen proveniente de OVM. Las medidas vigentes para mitigación de ese riesgo, ya comentadas, implican la delimitación de áreas de amortiguación. Dichas medidas, que son necesarias para asegurar la coexistencia entre cultivos de maíz Bt y variedades no modificadas, deberían armonizarse con los protocolos para certificación de semilla. El Instituto Nacional de Semillas (INASE) es el organismo que debería tener la competencia específica en esta área a nivel gubernamental, en articulación con las unidades del MGAP y la DINAMA.
- Existe suficiente evidencia al momento presente para considerar que los eventos MON 810 y Bt11 no son los adecuados para nuestra matriz de plagas. Si el país optara por el uso de OVM en la producción de maíz, deberían testearse otras toxinas con mayor especificidad para los lepidópteros que provocan el mayor daño económico. Las exotoxinas producidas por algunas cepas de Bt en estado vegetativo como la VIP3 han demostrado una toxicidad mucho más pronunciada para *A.ipsilon* y *S.frugiperda* (Estruch *et al.*, 1996).

- Los impactos de los CRI-Bt sobre la biodiversidad serán difíciles de evaluar en Uruguay hasta tanto no se cuente con relevamientos a mayor escala de resolución taxonómica y espacial, particularmente en los grupos de invertebrados terrestres. También sería importante contar con un sistema de información sobre biodiversidad que permitiera establecer modelos de distribución geográfica y sucesión temporal de las especies. En este sentido se destaca como positiva la existencia de formularios de registro de siembra y de transacción de maíz Bt. Se recomienda continuar con la aplicación de los mismos, mejorando su presentación y aprovechando la información que de ellos se obtiene.
- Consideraciones similares a la anterior deben hacerse con respecto a los impactos sobre compartimientos tróficos particulares (herbívoros, depredadores, parasitoides, detritívoros). No obstante debe señalarse que a nivel internacional la preocupación se ha centrado particularmente en los consumidores secundarios (depredadores y parasitoides) y en la biota edáfica.
- A nivel de consumidores secundarios, la información relevada sugiere que la estrategia de MRI podría estar afectando las distribuciones espaciales de los parasitoides y ello podría repercutir sobre los flujos génicos, disminuyendo la eficacia biológica de estas especies. Se recomienda estudiar particularmente este fenómeno, ya que un adecuado control de las poblaciones de plagas por sus enemigos naturales es uno de los factores que inciden en la productividad de nuestros ecosistemas. En lo que respecta a insectos depredadores, se señala una vez más el importante vacío de información en grupos clave como los neurópteros o los coleópteros.
- El estudio de la relación entre la persistencia de la toxina en el suelo y sus características físico-químicas (particularmente el contenido de arcillas) permitiría elaborar estrategias de manejo de los cultivos que minimicen los riesgos ambientales de la acumulación, especialmente donde no se aplique un esquema racional de rotaciones.

8. Referencias

- Abel CA, Adamczyk J (2004) Relative Concentration of Cry1A in Maize Leaves and Cotton Bolls with Diverse Chlorophyll Content and Corresponding Larval Development of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) on Maize Whorl Leaf Profiles. *Journal of Economic Entomology* **97**, 1737-1744.
- Al-Deeb MA, Wilde GE, Higgins RA (2001) No effect of *Bacillus thuringiensis* corn on the predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environmental Entomology* **30**, 625-629.
- Altieri M (2003) The sociocultural and Food Security impacts of genetic pollution via transgenic crops of traditional varieties in Latin America centers of peasant agriculture. *Bulletin of Science, Technology & Society* **23**, 350-359.
- Altieri M (2005) The Myth of coexistence: why transgenic crops are not compatible with agroecologically based systems of production. *Bulletin of Science, Technology & Society* **25**, 361-371.
- Altman DG, Bland JM (1995) Statistics notes: Absence of evidence is not evidence of absence. *BMJ* **311**, 485-.
- Andow DA, Hilbeck A (2004) Science-Based Risk Assessment for Nontarget Effects of Transgenic Crops. *BioScience* **54**, 637-649.
- Andow DA, Zwahlen C (2006) Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Letters* **9**, 196-214.
- ANZFA (2000) Food derived from insect-protected, herbicide-tolerant Bt-11corn. In: *Draft Risk Analysis Report*. (ed. (Australia New Zealand Food Authority)).
- Basso C, Morey C (1990). Biological control of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) with *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Uruguay. *Trichogramma and other egg parasitoids. San Antonio (Tx, USA) Ed. INRA, Paris 1991 (Les Colloques n° 56)* pp.165-160.
- Bates S, Zhao J, Roush RT, Shelton AM (2005) Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature Biotechnology* **23**, 57-62.
- Bauer L (1995) Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Florida Entomologist* **78**, 414-443.
- Bentancourt CM, Scatoni IB (1989) Lepidópteros de importancia económica en el Uruguay. In: *Nota técnica N° 7* (ed. FAGRO), pp. 1-57. Facultad de Agronomía. UdelaR, Montevideo.
- Bentancourt CM, Scatoni IB (2001) *Enemigos naturales. Manual ilustrado para la agricultura y la forestación*. Facultad de Agronomía - Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur., Montevideo.
- Bentancourt CM, Scatoni IB (2003) *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*. CD-ROM, Versión 1.2 para Windows. Facultad de Agronomía, Montevideo.
- Bernays EA, Chapman RF (1994) Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall., Nueva York.
- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL (2000) Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **32**, 156-173.

- Biezanko CM, Ruffinelli A, Carbonell CS (1957) Lepidoptera del Uruguay. Lista anotada de especies. *Revista de la Facultad de Agronomía* **46**, 1-152.
- Biezanko CM, Ruffinelli A, Link D (1974) Plantas y otras sustancias alimenticias de las orugas de los lepidópteros uruguayos. *Revista do Centro Ciências Rurais* **4**, 107-148.
- Biezanko CM, Ruffinelli A, Link D (1978) Catálogo de lepidopteros do Uruguai. *Revista do Centro Ciências Rurais* **8 (suplemento)**, 1-84.
- Blackwood C, Buyer J (2004) Soil microbial communities associated with Bt and Non-Bt corns in three soils. *Journal of Environmental Quality* **33**, 832-836.
- Brock TD, Madigan MT (1993) *Microbiología* Prentice-Hall, México.
- Brousseau R, Masson L, Hegedus D (1999) Insecticidal transgenic plants: are they irresistible? *AgBiotheNet* **1**, 1-10.
- Buntin G, All J, Dewey Lee R, Wilson D (2004) Plant-incorporated *Bacillus thuringiensis* resistance for control of Fall Armyworm and Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Journal of Economic Entomology* **97**, 1603-1611.
- Buntin G, Flanders K, Lynch R (2004) Assessment of experimental Bt events against Fall Armyworm and Corn Earworm in field corn. *Journal of Economic Entomology* **97**, 259-264.
- CalEPA (2000) Guidelines for Assessing ecological risks posed by chemicals. EPA, California. Disponible en: <http://www.epa.gov/ncea/>
- Casella E (2004) Cultivo de maíz 2003-2004. Informe. Cámara Uruguaya de Semillas (CUS). Plan de Manejo de Resistencia de Insectos (Refugio), Montevideo.
- CERV (Comisión de Evaluación de Riesgo de Vegetales Genéticamente Modificados) (2002) Documento sobre la liberación a producción y comercialización del evento MON 810 de maíz. CERV, Montevideo.
- Chapman MH, Hoy MJ (1991) Relative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and its predator *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Tetranychidae and Phytoseiidae). *Journal of Applied Entomology* **111**, 147-154.
- Chilcutt CF, Tabashnik BE (2004) Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7526-7529.
- Clavijo S, Pérez Greiner G (2000) Protección y sanidad vegetal. Insectos plagas del maíz. In: *Maíz en Venezuela*. (eds. Fontana H, González C). Fundación Polar, Caracas. Disponible en: http://www.plagas-agricolas.info.ve/doc/html/clavijo_s-perezg_g.html
- Coddington JA, Young LH, Coyle FA (1996) Estimating species richness in a southern Appalachian cove hardwood forest. *Journal of Arachnology* **24**, 111-128.
- Colwell RK, Coddington JA (1994) Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophy Transactions of the Royal Society of London B* **345**, 101-118.
- CUS (s/fecha) Utilización de refugios para el barrenador del tallo en maíces Bt. Cámara Uruguaya de Semillas. Refugio, Montevideo.
- Dalecky A, Ponsard S, Bailey RI, Péliissier C, Bourget D (2006) Resistance Evolution to Bt Crops: Predispersal Mating of European Corn Borers. *PLOS Biology* **4**, 1048-1057.
- Dean JM, De Moraes CM (2006) Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. *J Chem Ecol* **32**, 713-724.

- DSTA-UB-MATT (2005) Studio dell'impatto derivante dal rilascio deliberato nell'ambiente di piante geneticamente modificate (PGM) sulle popolazioni di artropodi e altri invertebrati negli ecosistemi agricoli interessati. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali - Alma Mater Studiorum-Università di Bologna-Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Direzione generale per la salvaguardia ambientale, Bologna. Disponibile en: <http://www.entom.agrsci.unibo.it/Eventi/impatto%20GM%20artropodofauna.pdf>
- Dubelman S, Ayden BR, Bader BM, *et al.* (2005) Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use. *Environmental Entomology* **34**, 915-921.
- Dunfield KE, Germida JJ (2004) Impact of genetically modified crops on soil-and-plant-associated communities. *Journal of Environmental Quality* **33**, 806-815.
- Einspanier R, Lutz B, Rief S, *et al.* (2004) Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *European Food Research and Technology* **218**, 269-273.
- Emberlin J, Adams-Groom B, Tidmarsh J (1999) A report on the dispersal of maize pollen. Soil Association. Disponibile en: <http://www.mindfully.org/GE/Dispersal-Maize-Pollen-UK.htm>
- EPA (1998) *Guidelines for Ecological Risk Assessment* EPA, Washington. Disponibile en: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=12460>
- EPA (2001) Bt-Plant Incorporated Protectants October 15, 2001 Biopesticides Resgistration Action Document. Disponibile en: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad2/3-ecological.pdf
- Estada U, Ferré J (1992) Laboratory selection of *Tricoplusia ni* for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab d-endotoxin. *Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology*. 25th, Heidelberg.
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, *et al.* (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 5389-5394.
- Evans HF (2002) *Environmental Impact of Bt Exudates from Roots of Genetically Modified Plants*. Final Report. UK Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA) Research Contract EPG 1/5/156. Disponibile en: http://www.defra.gov.uk/science/Project_Data/DocumentLibrary/CB02007/CB02007_2735_FR_P.pdf
- Evia G, Gudynas E (2001) *Ecología del Paisaje en Uruguay. Aportes para la conservación de la Diversidad Biológica* DINAMA - Junta de Andalucía, Montevideo.
- Facultad de Agronomía (2002) *Informe sobre la liberación comercial del evento MON 810. Maíz-Bt (Transgénico)*. Comisión Técnica Interdepartamental instaurada por Decanato.
- Fang M, Kremer RJ, Motavalli PP, Davis G (2005) Bacterial Diversity in Rhizospheres of Nontransgenic and Transgenic Corn. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4132-4136.
- FAO/OMS (2005) *Comisión del Codex Alimentarius. Manual de Procedimiento.*, 15 edn., Roma. Disponibile en: ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_15s.pdf .
- Fava FD, Imwinkelried JM, Trumper EV (2004) Manejo del barrenador del tallo de maíz *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Ediciones INTA. *Boletín* N° 6. EEA Manfredi. Córdoba.

- Frioni L (1999) *Procesos Microbianos* Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.
- Frizzas MR (2003) *Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a comunidade de insetos* Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- Frommel M, Capdevielle F, Costa B, Machado J (2006) Evolución del análisis de riesgo de vegetales genéticamente modificados en Uruguay. In: *Transgénicos en Uruguay – Construyendo una realidad participativa*. Proyecto Desarrollo del Marco Nacional de Bioseguridad – URU-04-009 Serie Técnica 1,11-18.
- Gamundi JC, Riart S, Lenzi L, Capelo G (2002) *Evaluación de cultivos Bt*. Resumen de actividades desarrolladas (año 2001/02). Convenio de Asistencia Técnica INTA EEA Oliveros – Monsanto Argentina s.a. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/oliveros/info/documentos/convenios/monsanto.htm>
- Georghiou, GP, Lagunes-Tejeda A (1991) *The occurrence of resistance to pesticides in arthropods*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma
- Giménez L (2001) Maíz. Estación experimental "Dr. Mario A. Cassinoni". Departamento de Producción Vegetal. Unidad de Cereales y Cultivos Industriales-Facultad de Agronomía, Montevideo.
- Godfray HCJ (1994) *Parasitoids: behavioural and evolutionary ecology*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Gotelli NJ, Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4, 379-391.
- Gould F (1988) Evolutionary biology and genetically engineered crops: Consideration of evolutionary theory can aid in crop design. *BioScience* 38, 26-33.
- Gould F (1994) Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. *Biocontrol Science Technology* 4, 451-461.
- Gould F, Tabashnik B (1998) Bt- Cotton resistance management. In: Mellon, M. & J. Rissler (Eds.) *Now or never: serious new plans to save a natural pest control*. Union of Concerned Scientists. Cambridge (USA).
- Gould F, Tabashnik B, Hutchison W, Ferro D, Andow D, Whalon M (1998) Recommendations for developing and implementing resistance management plans for Bt-Toxin producing crops. In: Mellon, M. & J. Rissler (Eds.) *Now or never: serious new plans to save a natural pest control*. Union of Concerned Scientists. Cambridge (USA).
- Greco N (1995) Densidad y número de generaciones de *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera: Pyralidae) en el maíz de la zona marginal sur de la región maicera típica de la Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)* 71, 61-66.
- Greenpeace (1999) El maíz producido genéticamente por Novartis: una gran amenaza para la salud ambiental, humana y animal. *Biodiversidad* 21. Disponible en: <http://www.grain.org/biodiversidad/?id=83>
- Grela I (2004) *Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay*. Tesis de maestría en Botánica, PEDECIBA-Universidad de la República, Montevideo.
- Groot AT, Dicke M (2002) Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. *The Plant Journal* 31, 387-406.

- Hanley AV, Huang ZY, Pett WL (2003) Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *Journal of Apicultural Research* **42**, 77-81.
- Harwood JD, Wallin WG, Obrycki JJ (2005) Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Molecular Ecology* **14**, 2815-2823.
- Hilbeck A, Andow DA (2004) A Case Study of Bt Maize in Kenya. In: *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms* eds. Kapuscinski AR, Schei PJ), p. xviii+283. CAB International, Wallingford, UK.
- Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, Filippini A, Bigler F (1998a) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology* **27**, 1255-1263.
- Hilbeck A, Baumgartner M, Fried PM, Bigler F (1998b) Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology* **27**, 481-487.
- Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, Filippini A, Bigler F (1999) Prey-mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator *Chrysoperla carnea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **91**, 305-316.
- Horner TA, Dively GP (2003) Effect of MON810 Bt Field Corn on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Cannibalism and Its Implications to Resistance Development. *Journal of Economic Entomology* **96**, 931-934.
- Horner TA, Dively GP, Herbert DA (2003) Development, Survival and Fitness Performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in MON810 Bt Field Corn. *Journal of Economic Entomology* **96**, 914-924.
- Huang F, Higgins RA, Buschman LT (1997) Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* **90**, 1137-1143.
- Huang F, Rogers Leonard B, Gable RH (2006) Comparative susceptibility of European Corn Borer, Southwestern Corn Borer, and Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab protein in a commercial *Bacillus thuringiensis* corn hybrid. *Journal of Economic Entomology* **99**, 194-202.
- Iannone N, Couretot A, Cacciamani M (2004) Evaluación técnico-económica de la tecnología de Control de *Diatraea* en el Cultivo de Maíz, pp. 1-5. INTA, Pergamino.
- ILSI (1998) *An evaluation of insects resistance management in Bt field corn: A science-based framework for risk assessment and risk management* ILSI Press (International Life Science Institute), Washington D.C.
- James C (2005) Situación Global de los cultivos transgénicos/GM comercializados: 2005. Resumen ejecutivo. In: *Brief 34. ISAAA. International Service for the acquisition of agro-biotech applications*. Disponible en: <http://www.isaaa.org/>
- Johnson MT (1997) Interaction of resistant plants and wasp parasitoids of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* **26**, 207-214.
- Jolivet P (1992) *Insects and plants: parallel evolution and adaptations*, 2 edn. Sandhill Crane Press, Florida (USA).

- Kleter GA, Peijnenburg ACM, Aarts HJM (2005) Health Considerations Regarding Horizontal Transfer of Microbial Transgenes Present in Genetically Modified Crops. *J Biomed Biotechnol.* **2005**, 326-252.
- Krebs JR, Wilson JD, Bradbury RB, Siriwardena GM (1999) The second silent spring? *Nature* **400**, 611-612.
- Letorneau DK, Robinson GS, Hagen JA (2003) Bt crops: Predicting effects of escaped transgenes on the fitness of wild plants and their herbivores. *Environmental Biosafety Research* **2**, 219-246.
- Liu YB, Tabashnik B (1997) Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **264**, 605-610.
- Lo Pinto M, Wajnberg E, Colazza S, Curty C, Fauvergue X (2004) Olfactory response of two aphid parasitoids, *Lysiphlebus testaceipes* and *Aphidius colemani*, to aphid-infested plants from a distance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **110**, 159-164.
- López MD, Prasifka JA, Bruck DJ, Lewis LC (2005) Utility of ground beetle species in field tests of potential nontarget effects in Bt crops. *Environmental Entomology* **34**, 1317-1324.
- Losey JE, Raynor LS, Carter ME (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* **399**, 214.
- Losey JE, Obrycki JJ, Hufbauer RA (2004) Biosafety Considerations for Transgenic Insecticidal Plants: Non-Target Predators and Parasitoids. In: *Encyclopaedia of Plants and Crop Science*. (ed. R.M. G), pp. 156-159. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Lövei GL, Arpaia S (2005) The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **117**, 1-14.
- Luna S, Figueroa J, Baltazar B, et al. (2001) Maize Pollen Longevity and Distance Isolation Requirements for Effective Pollen Control. *Crop Science* **41**, 1551-1557.
- Luttrell RG, Wan L, Knighten K (1999) Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* **92**, 21-32.
- Ma BL, Subedi KD, Reid LM (2004) Extent of Cross-Fertilization in Maize by Pollen from Neighboring Transgenic Hybrids. *Crop Science* **44**, 1273-1282.
- Magurran AE (1998) *Ecological diversity and its measurement* Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Malone LA, Pham-Delègue MH (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* **32**, 1-18.
- Margalef R (1993) *Teoría de los sistemas ecológicos*. Universitat de Barcelona., Barcelona.
- Martel C, Réjasse A, Rousset F, Bethenod MT, Bourguet D (2003) Host-plant-associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity* **90**, 141-149.
- Marvier M (2001) Ecology of transgenic crops. Genetically engineered plants might generate weed problems and affect nontarget organisms, but measuring the risk is difficult. *American Scientist* **89**, 160-168.
- Masson L, Tabashnik BE, Liu YB, Brousseau R, Schwartz JL (1999) Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J Biol Chem* **274**, 31996-32000.

- May RM (1993) Resisting resistance. *Nature* **361**, 593-594.
- Mc Gaughey WH (1985) Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**, 193-195.
- Mc Gaughey WH (1994) Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Agr. Ecosystem. Environ.* **49**, 95-102.
- Mc Gaughey WH, Whalon ME (1992) Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* **258**, 1451-1455.
- Mellon M, Rissler J (1998) Now or never: serious new plans to save a natural pest control. Union of Concerned Scientists, Cambridge (USA).
- Moar WJ, Puzsai-Carey M, Van Faassen H, *et al.* (1995) Development of *Bacillus thuringiensis* CryI_{Ac} resistance by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Environmental Microbiology* **61**, 2086-2092.
- Monsanto (2006a) *Guía 2006 de Buenas Prácticas para el cultivo de maíz Bt*. Disponible en: <http://www.monsanto.es/Novedad/Folleto%20aprose%202006.pdf> .
- Monsanto (2006b) *Guía técnica para el cultivo de variedades de maíz Yieldgard[®], protegidas contra taladros*. Disponible en: <http://www.monsanto.es/Novedad/GUIA%20yieldgard%202006.pdf>
- Monsanto (2006c) Seguridad del maíz MON810 genéticamente protegido contra taladros. *Cuaderno técnico Nº 2*. Disponible en: <http://www.monsanto.es/Novedad/YIELGARD.pdf>
- Motavalli PP, Kremer RJ, Fang M, Means NE (2004) Impact of Genetically Modified Crops and Their Management on Soil Microbially Mediated Plant Nutrient Transformations. *J Environ Qual* **33**, 816-824.
- Munkvold GP, Hellmich RL, Rice LG (1999) Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Disease* **83**, 130-138.
- Murúa G, Virla E (2004) Population parameters of *Spodoptera Frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucumán (Argentina). *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* **20**, 199-210.
- NK[®] Brand (2005) *Grower Guide*. Syngenta Seeds. Disponible en: <http://www.nk-us.com/MC%20533-5%20GrowerGuide%20FINAL.pdf>
- Obyrcki JJ, Losey JE, Taylor O, Hansen LC (2001) Transgenic insecticidal corn: Beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *BioScience* **51**, 353-361.
- Omenn GS, Kessler AC, Anderson NT, *et al.* (1996) Risk Assessment and Risk Management in Regulatory Decision-Making. Commission on Risk Assessment and Risk Management. Draft Report for Public Review and Comment. Disponible en: http://www.riskworld.com/Nreports/1996/risk_rpt/html/nr6aa001.htm#TC1
- Orr DB, Landis DA (1997) Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *Journal of Economic Entomology* **90**, 905-909.
- Pilcher CD, Rice ME, Obyrcki JJ (2005) Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five nontarget arthropods. *Environmental Entomology* **34**, 1302-1316.
- Pimentel DS, Raven PH (2000) Bt corn pollen impacts on nontarget Lepidoptera: Assessment of effects in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 8198-8199.
- Polanczyk R, Alves S (2003) *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisao. *Agrociencia* **VII**, 1-10.

- Poverene M, Ureta S (2004) Flujo génico mediado por polen y su posible impacto ambiental. In: *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. (eds. Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L), pp. 399-408. INTA, Buenos Aires.
- Rahardja U, Whalon ME (1995) Inheritance to resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* CryIII A delta-endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* **88**.
- Raps A, Kehr J, Gugerli P, *et al.* (2001) Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol Ecol* **10**, 525-533.
- Raynor GS, Ogden EC, Hayes JV (1972) Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal* **64**, 420-427.
- Ribeiro A (2000) Manejo de insectos plaga. In: *Manejo de Plagas en pasturas y cultivos*. INIA. *Serie Técnica n° 112* (eds. Zerbino MS, Ribeiro A), pp. 1-12.
- Ricklefs RE, Schluter D (1993) Species diversity in Ecological communities. The University of Chicago Press, Chicago.
- Ríos A (2005) Resistencia de malezas a herbicidas. In: *Resistencia de malezas a herbicidas* (ed. INIA), pp. 1-6. INIA - AUSID - CALMER, Mercedes.
- Sánchez G, Ruiz JA (1996) Distribución del teosinte en México. In: *Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teosinte: Implicaciones para el maíz transgénico* (eds. Serratos JA, Wilcox MC, Castillo F), pp. 20-38. CIMMYT, México, D.F.
- Sánchez-Soto S, Nakano O (2003) Novo registro de lepidoptera na cultura do milho no Brasil. *Neotropical Entomology* **32**, 365-366.
- Saxena D, Stotzky G (2001a) *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.
- Saxena D, Stotzky G (2001b) Bt corn has a higher lignin content than Non-Bt corn. *American Journal of Botany* **88**, 1704-1706.
- Saxena D, Flores S, Stotzky G (1999) Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from *Bacillus thuringiensis* corn. *Nature* **402**.
- Saxena D, Flores S, Stotzky G (2002) Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology & Biochemistry* **34**, 133-137.
- SCDB (1993) *Texto en español del Convenio sobre la Diversidad Biológica*. SCDB (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica). Disponible en: <http://www.biodiv.org/doc/legal/cdb-un-es.pdf>
- SCDB (2000) *Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos*. SCDB (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica). Montreal.
- Scriber JM (2001) Bt or not Bt: Is that the question? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 12328-12330.
- Sears MK, Stanley-Horn DE, Mattila HR (2000) Preliminary report on the Ecological Impact of BT corn pollen on the Monarch Butterfly in Ontario, pp. 1-17. Canadian Food Inspection Agency and Environment, Ontario.

- Sears MK, Hellmich RL, Stanley-Horn DE, *et al.* (2001) Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 11937-11942.
- Sganga JC (1994) Caracterización de la vegetación de la República Oriental del Uruguay. In: *Contribución de los estudios edafológicos al conocimiento de la vegetación en la República Oriental del Uruguay. Boletín técnico N° 13*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Montevideo.
- Shiojiri K, Takabayashi J, Yano S, Takafuji A (2002) Oviposition preferences of herbivores are affected by tritrophic interaction webs. *Ecology Letters* **5**, 186-192.
- Siegfried BD (2000) Bt transgenic plants for pest management. Challenges and opportunities *Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of GMO's*. Saskatoon, Canada.
- Sims SR, Stone TB (1991) Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology* **57**, 206-210.
- Snow A (2002) Transgenic crops-why gene flow matters. *Nature Biotechnology* **20**, 542.
- Snow A (2003) Unnatural selection. *Nature* **424**, 619.
- Snow AA, Morán Palma P (1997) Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience* **47**, 86-96.
- Snow A, Andow D, Gepts P, *et al.* (2005) ESA Report. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecological Applications* **15**, 377-404.
- Strong DR, Lawton JH, Southwood TRE (1984) *Insects on Plants - Community patterns and mechanisms* Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Syngenta (2004) *Bt-11 sweet corn update*. Syngenta seeds Inc. Disponible en: http://www.syngenta.com/en/downloads/Bt_sweet_corn_update_3-04_final.pdf
- Tabashnik BE (1994a) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* **39**, 47-79.
- Tabashnik BE (1994b) Delaying insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **255**, 7-12.
- Tabashnik BE (1997) Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3488-3490.
- Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW (1991) Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* **84**, 49-55.
- Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson MW (1990) Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* **83**, 1671-1676.
- van Frankenhuyzen K, Nystrom C (2002) The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. (ed. NRC). Disponible en: <http://www.glfccfs.nrcan.gc.ca/bacillus>
- Van Rie JS (1991) Insect control with transgenic plants: resistance proof? *Trends in Biotechnology* **9**, 177-179.

- Wandeler H, Bahylova J, Nentwig W (2002) Consumption of two Bt and six non-Bt corn varieties by the woodlouse *Porcellio scaber*. *Basic and Applied Ecology* **3**, 357-365.
- Willink E, Osoreo VM, Costilla MA (1991) El gusano "Cogollero": nivel de daño económico. *Avance Agroindustrial* **12**, 25-26.
- Wolt JD, Peterson RKD, Bystrak P, Meade T (2003) A screening level approach for nontarget insect risk assessment: transgenic Bt corn pollen and the Monarch butterfly (Lepidoptera: Danaidae). *Environmental Entomology* **32**, 237-246.
- Wraight CL, Zangerl AR, Carroll MJ, Berenbaum MR (2000) Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 7700-7703.
- Zangerl AR, McKenna D, Wraight CL, *et al.* (2001) Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**.
- Zerbino MS, Fassio A (1995) Insectos plagas en maíz. In: Boletín de divulgación nº 51. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela. Colonia.
- Zwahlen C, Hilbeck A, Howald R, Nentwig W (2003a) Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Mol Ecol* **12**, 1077-1086.
- Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P, Nentwig W (2003b) Degradation of the *Cry1Ab* protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Mol Ecol* **12**, 765-775.

9. Anexo

Lepidópteros de importancia económica en maíz en Uruguay

Especie	<i>Agrotis ipsilon</i> (Hüfnagel) (Lep: Noctuidae)	<i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius) (Lep: Pyralidae)	<i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith) (Lep: Noctuidae)
Nombre común	Lagarta cortadora	Barrenador del tallo	Lagarta cogollera; oruga militar tardía
Distribución	Cosmopolita	Neotropical	Neotropical
Hospederos	Poaceae, Chenopodiaceae Solanaceae	Poaceae	Poaceae Chenopodiaceae Solanaceae
Fenología	¿3 ciclos anuales? Setiembre – marzo Sobrevive el invierno como pupa enterrada.	3 o 4 ciclos anuales Fines de agosto – abril Sobrevive el invierno como larva dentro de los tallos.	¿2 o 3 ciclos anuales? Setiembre – marzo Sobrevive el invierno como pupa enterrada.
Huevos	1500-2000	300 en masas de 10 a 50	500 a 2000
Desarrollo embrionario	4-5 días	6-7 días	3-7 días
Larva	Duración :5 a 9 semanas 6 instars L1 y L2 tienen fototropismo positivo L3 se entierra y busca alimento de noche	Duración: 3 a 5 semanas 6 instars L1 y L2 raspan las hojas A partir de L3 barrenan el tallo y se alimentan dentro de él.	Duración: variable según la temperatura, en regiones tropicales 2 semanas. 6 instars L1 y L2 raspan hojas L3- L6 cogollo y mazorca en estado lechoso.
Pupa	2 a 3 semanas Hipogea (diapausa)	1 – 2 semanas en el tallo	1 – 2 semanas Hipogea (invernante)
Adulto	Oviponen 3-4 días después de emerger		Oviponen 2 o 3 días después de emerger
Daños	Importante en la implantación. Corta plantas. Noviembre y diciembre. Ataca hasta que el cultivo tiene 50cm. Destruye aproximadamente 4 plantas en estado larval. Prefiere plantas en estadios vegetativos tempranos (V1-V4) Nivel de control: 5-7% de plantas dañadas	No pérdidas debidas al quebrado de la planta. Larva ataca tejido foliar en L1 – L2 pero a partir de L2 ingresan al tallo. Al barrenar el tallo puede disminuir el rendimiento de la planta por destruir los haces vasculares o incluso matar plantas jóvenes por destrucción del brote terminal. Los orificios de entrada y las galerías aumentan también la incidencia de patógenos como la podredumbre del tallo	Acentuados en siembra tardía y en condiciones de baja fertilidad y estrés hídrico. Importantes en todos los estadios fenológicos del maíz: Implantación: actúa como cortadora Vegetativo: cogollera. En V8-10 el rendimiento de la planta se reduce un 20%. Como consecuencia de esto aparecen líneas alargadas en las hojas. Reproductivo: Espigas.
Manejo		En Argentina se utiliza como medida de decisión para el control la captura de más de 100 adultos en trampa de luz y la postura en trampas.	Siembra temprana.

Adaptado de Willink *et al.*, 1991; Greco, 1995; Zebino & Fassio, 1995; Bentancourt & Scatoni, 2001, 2003; Fava *et al.*, 2004