

Impacto del maíz *Bt* en la conservación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*)

Impact of *Bt* corn on the conservation of the monarch butterfly (*Danaus plexippus*)

Astrid Stefanía Duarte Trujillo¹, Julio Amilcar Pineda Insuasti².

¹ Organización Micológica Internacional (OMI), Florencia, Colombia.

² Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

Autor para correspondencia: stefan-ing.agroind@hotmail.com

Recibido: octubre 20 de 2017

Aceptado: diciembre 05 de 2017

RESUMEN

Investigaciones apresuradas afirmaron que el polen del maíz *Bt* afectaba la conservación de *Danaus plexippus*, lo que generó una polémica científica. El propósito de este artículo es describir los hallazgos de la ciencia con respecto al impacto de los cultivos de maíz *Bt* en la conservación de dicha especie de lepidóptero. Se encontró que la existencia de estos cultivos no afecta la conservación de la *D. plexippus*, debido a que la mayoría de híbridos comerciales no expresan las proteínas Cry en el polen y tienen anti-toxinas en su ADN, que evitan atacar insectos no objetivo. Además, la superposición espacio-temporal entre la producción de polen en plantas de maíz y la etapa larval de la mariposa monarca es muy baja, alrededor del 19%.

PALABRAS CLAVE: Organismo modificado genéticamente, planta transgénica, proteínas Cry.

ABSTRACT

Hasty researches stated that *Bt* corn pollen affecting the conservation of the monarch butterfly, which generated a scientific controversy. The purpose of this paper is to describe the findings of science regarding the impact of *Bt* maize crops in the conservation of said lepidopteran species. It was found that the existence of *Bt* maize crops does not affect the monarch conservation because most commercial hybrids do not express the Cry proteins in pollen and have anti-toxins incorporated in DNA that avoid attack to objective insects. In addition, the space-time overlap between production of pollen in maize plants and the larval stage of the monarch butterfly is very low, about 19%.

KEYWORDS: Genetically modified organisms, transgenic plant, cry protein.

INTRODUCCIÓN

El término transgénico hace referencia a células de plantas en las que se ha incorporado a su genoma genes de interés que expresan características deseadas, es decir, que dichas células vegetales han sido transformadas. Las

dos técnicas de transformación más utilizadas son la inserción mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y la biobalística (Wisniewski, Frangne, Massonneau, y Dumas, 2002). El uso de transgénicos promete aliviar el hambre y reducir los efectos adversos de la agricultura moderna en el medio natural mediante la

reducción de los agro-insumos y laboreo agrícola. Sin embargo las preocupaciones por algunos riesgos hipotéticos se abordan constantemente como los concernientes a la salud humana, la nutrición, el medio ambiente natural, la viabilidad económica y el desarrollo rural (Morales-Estupiñán, 2001); lo cual resulta absurdo, pues los procesos moleculares de la transgénesis son similares a los de la mutación natural (Ammann, 2014).

La investigación y el desarrollo de los OGM para la alimentación se han condensado en unos pocos cultivos básicos como soja, maíz, canola, arroz, trigo, algodón, tabaco y patata, definidos principalmente por su valor real o potencial en el mercado (Nelson, 2001). El maíz ha sido priorizado porque corresponde al 39,7 % de la producción mundial de cereales, siendo Estados Unidos, Alaska y China los principales productores. Para el año 2015 se reportó una producción mundial de aproximadamente un millón de toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2014, 2016). Los cultivos de maíz padecen constantemente ataques por insectos tipo lepidóptero y coleóptero, lo que genera pérdidas en producción y aumento de los costos agrícolas al incrementar los requerimientos de insumos para su tratamiento. La biotecnología ha sido útil en la búsqueda de soluciones para dicho problema, pues modificó genéticamente el ADN del maíz con genes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que expresan proteínas Cry, las cuáles resultan tóxicas para dicha plaga.

En particular, la adopción de los cultivos *Bt* resistentes a los insectos, representa una oportunidad para reemplazar el uso de insecticidas de origen sintético (Ammann, 2005), hecho reconocido por la escritora ambientalista Rachel Carson (1962) en su libro "La Primavera Silenciosa". Aunque, el cultivo a gran escala del maíz transgénico *Bt* generó gran preocupación en la comunidad del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) porque estudios prematuros en 1999 señalaron que el polen transgénico

generaban efectos adversos en la conservación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*), una especie considerada "buque insignia de conservación" en Norteamérica (Losey, Rayor, y Carter, 1999).

Por lo tanto, el objetivo de éste trabajo es describir los hallazgos de la ciencia con respecto al impacto de los cultivos de maíz *Bt* en la conservación de la mariposa monarca, mediante una revisión de la literatura científica y un análisis comparativo que permita clarificar la polémica.

LA MARIPOSA MONARCA

La mariposa monarca (*Danaus plexippus*), es una especie de lepidóptero ditrisio de la familia Nymphalidae. Sus alas tienen un patrón de colores naranja, blanco y negro fácilmente reconocible, que alerta de su toxicidad a sus predadores, la cual es adquirida de los glucósidos cardíacos presentes en el algodoncillo del que se alimentan (Scott, 1986).

Por lo general, las mariposas monarcas completan un ciclo de vida de aproximadamente dos meses, distribuidos en cuatro días como huevo, dos semanas como oruga, 10 días como crisálida y de entre dos a seis semanas como mariposa (Galindo-Leal y Rendón-Salinas, 2005); no obstante, existe una generación de mariposas monarca mucho más resistente y longeva denominada "matusalén" porque puede llegar a vivir hasta nueve meses. La generación Matusalén nace durante verano y otoño, luego migra a los bosques para pasar el invierno y regresa durante la primavera a reproducirse; las mariposas del este de las montañas rocosas de Estados Unidos (Aprox. 95 %), migran hacia los estados de México y Michoacán (México), mientras las del oeste migran a la costa de California. Las mariposas ovipositan en las asclepias o plantas de algodoncillo, las cuales crecen por lo general en los campos de maíz; se alberga allí hasta que desarrolla sus alas y migra (Galindo-Leal y Rendón-Salinas, 2005).

LAS PROTEÍNAS CRY

Son proteínas de inclusión que comprenden al menos 50 subgrupos con más de 200 miembros (Crickmore *et al.*, 1998); son secretadas por la bacteria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) en forma de cristales para-esporales durante la fase de esporulación. Estos cristales se conforman no sólo de las proteínas de cristal (Cry) que presentan actividad entomopatógena sino también de toxinas citolíticas (Cyt) que evidencian actividad hemolítica. Los dos componentes de los cristales se denominan en conjunto δ -endotoxinas (Bravo, Gill, y Soberón, 2005).

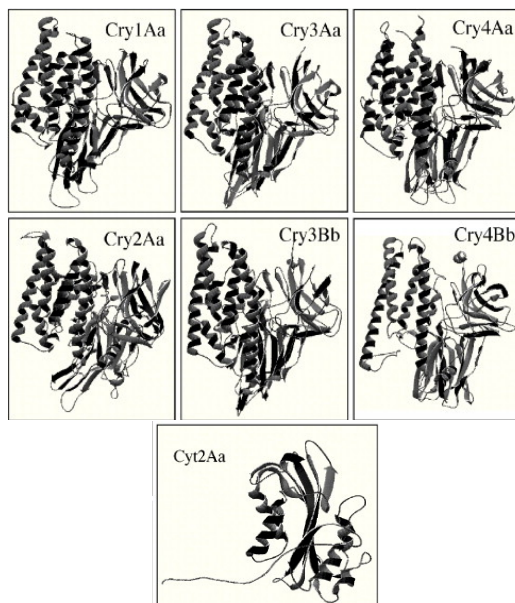


Fig. 1. Estructura tridimensional de toxinas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis* (Bravo *et al.*, 2007)

Las proteínas Cry contienen protoxinas con dos longitudes diferentes y tres dominios estructurales enlazados por conectores individuales: el primero consta de siete hélices alfa, el segundo de tres láminas beta anti-paralelas y el tercero de un beta-sandwich. Hasta la fecha, han sido determinadas por cristalografía de rayos x las estructuras terciarias de seis proteínas Cry de tres dominios diferentes, como indica la fig. 1

(Bravo, Gill y Soberón, 2007; de Maagd, Bravo, y Crickmore, 2001).

Las proteínas Cry resultan tóxicas sólo para los órdenes de insectos Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera y Díptera, así como para nematodos (Crickmore *et al.*, 1998). Presentan una actividad tan específica que tienen poco o ningún efecto contra organismos no objetivo, además, las toxinas se expresan dentro de los tejidos de la planta, minimizando la exposición de los animales que no se alimentan de las plantas de cultivo (Ammann, 2005).

MODO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY

Las proteínas cry pertenecen al grupo de Toxinas Formadoras de Poros (TFP), son secretadas en forma de inclusiones cristalinas que se disuelven en el ambiente alcalino del intestino de las larvas objetivo que les ingieren. Una vez liberadas, las protoxinas Cry son activadas por proteasas intestinales que les escinden, lo que implica la eliminación proteolítica del N-terminal de un péptido específico y aproximadamente la mitad del del C-terminal (Bravo *et al.*, 2005; de Maagd *et al.*, 2001).

Como la toxina activada es soluble en agua, se une a receptores específicos del borde en cepillo, el cual está conformado por las microvellosidades de los enterocitos (células columnares) del epitelio intestinal del huésped. La toxina sufre cambios conformacionales tipo oligomérico pre-poro, es decir, que polimeriza y forma oligómeros, lo que le permiten insertarse o trasladarse a través de la membrana, conduciendo a la formación de poros líticos en las microvellosidades apicales, fuga de iones y contaminación, desencadenando una septicemia grave, y finalmente la muerte del insecto (Bravo *et al.*, 2005; de Maagd *et al.*, 2001; Soberón *et al.*, 2012). Se desconoce con exactitud el número de monómeros que se asocian en la estructura oligomérica, aunque algunos estudios sugieren que tres, otros que

cuatro (Soberón *et al.*, 2012). En cuanto a las proteínas receptoras se han descrito al menos cuatro para toxinas Cry1A en diferentes insectos lepidópteros: Una proteína-cadherina como (CADR), un glicosilfosfatidil-inositol (GPI) anclada aminopeptidasa-N (APN), una fosfatasa alcalina anclada a GPI (ALP) y un glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.*, 2007).

Existen ciertos mecanismos de resistencia del huésped que implican la síntesis de anticuerpos inhibidores de la unión de las toxinas Cry a los receptores Bt (Bravo *et al.*, 2007), lo cual ha generado preocupación acerca de la vida útil de *Bacillus thuringiensis* como bioplaguicida. Se han desarrollado soluciones como el desarrollo de las proteínas Cry1AMod, versiones de Cry1Ab que carecen del extremo amino-terminal por lo que son capaces de polimerizar sin necesidad de la unión al receptor cadherina, por lo tanto, resultan tóxicas para los insectos objetivo resistentes. Estas versiones deben combinarse con promotores cry3A que presenten mutaciones de cisteína individuales para su expresión eficaz (Bravo *et al.*, 2015; García-Gómez *et al.*, 2013). También se han planteado refugios, que comprenden la inclusión de al menos un 20 % de maíz no *Bt* dentro de media milla de maíz *Bt*, sembrado fuera de zonas de cultivo de algodón, con un monitoreo de la resistencia del insecto al bioplaguicida (US Environmental Protection Agency [USEPA], 2001).

INFLUENCIA DEL MAÍZ BT EN LA CONSERVACIÓN DE LA MARIPOSA MONARCA

Losey y colaboradores (1999) alimentaron a las orugas de la Mariposa Monarca con algodoncillo contaminado con polen de maíz *Bt*, obteniendo que el 50 % presentó menor crecimiento y murió prematuramente. Concluyeron que el polen del maíz transgénico tenía profundas implicaciones para la conservación de la mariposa monarca. Para corroborar ésta información, Hansen-Jesse y Obrycki (2000) realizaron un estudio en el cual

alimentaron larvas de mariposa monarca durante 48 horas con algodoncillo espolvoreado con polen *Bt*, con polen no *Bt* y sin espolvorear; alcanzando tasas de mortalidad del 20 %, 3 % y 0 % respectivamente. Afirmaron que los efectos del polen de maíz *Bt* sobre las larvas eran visibles en las fronteras de campos transgénicos hasta los 10 m y mortal para las que se alimentaran de plantas de algodoncillo a una distancia de menos de metros del borde del cultivo de maíz (Hansen-Jesse y Obrycki, 2000). Sin embargo, la evaluación de riesgos en ambas investigaciones estaba incompleta porque no tuvieron en cuenta los niveles de exposición temporal ni espacial (Sears *et al.*, 2001), así como la dosis de polen en las hojas y la reproducibilidad de las condiciones experimentales empleadas en situaciones reales (Gatehouse, Ferry, y Raemaekers, 2002).

Por su parte, la USEPA (2001) afirmó que es poco probable que el polen *Bt* le resulte tóxico a la especie, lo que se debe a que en la mayoría de los híbridos de maíz comerciales la expresión de la toxina en el polen es baja, además, estudios de toxicidad en laboratorio y campo no mostraron efectos adversos en la mariposa, tras exponerla a diferentes densidades de polen *Bt* (Sears *et al.*, 2001). La oviposición tampoco se ve afectada por la presencia del cultivo *Bt*, ya que la mariposa monarca deposita similar cantidad de huevos tanto en el algodoncillo que ha crecido dentro de campos de maíz *Bt* como en el que ha crecido al borde de la carretera (Jesse y Obrycki, 2003).

Surgieron luego acusaciones de toxicidad del polen *Bt* en otro tipo de lepidópteros no objetivo como el *Papilio machaon* L. o cola de golondrina común (Lang y Vojtech, 2006) y la larva de *Inachis io* o mariposa pavo real (Holst, Lang, Lövei, y Otto, 2013), por lo cual expertos en biología molecular desarrollaron mutantes Dominantes Negativos (DN), también llamados anti-toxinas, que pueden inhibir la toxicidad de las proteínas *Bt* en insectos no objetivo

mediante sustitución de los residuos del hélice α -4 por cisteína (Girard *et al.*, 2008).

Algunos autores reconocen que el cultivo *Bt* tiene un impacto positivo significativo en la diversidad ecológica, la contaminación ambiental y la sostenibilidad económica de los agroecosistemas al provocar la disminución del uso de insecticidas sintéticos (Walker y Frederick, 2011). Estudios comparativos evaluaron el impacto del polen *Bt* que no expresa proteínas Cry y el pesticida λ -cihalotrina, encontrando que el primero es insignificante mientras el segundo resulta mortal para las larvas monarca (Stanley-Horn *et al.*, 2001).

En efecto, el aumento de cultivos de maíz *Bt* en los últimos años no afecta la población y conservación de las mariposas monarca, ya que según la organización Monarch Watch (2016), la población de mariposas monarca se duplicó durante el 2016, gracias a las condiciones climáticas favorables para la etapa larval durante 2015. La principal amenaza para la población monarca es la pérdida de hábitats cruciales de invierno en el sur de California y el centro de México; y las inadecuadas prácticas agrícolas como el control de malezas que arrasa con los cultivos de algodóncillo o el uso de insecticidas sintéticos (Bravo *et al.*, 2007). Para el año 2009 se reportó en el centro-norte de Estados Unidos una disminución del 90 % de las áreas de algodóncillo en comparación con 1999, probablemente a causa del uso indiscriminado del glifosato (Hartzler, 2010).

VARIABLES DE IMPACTO

Tipo de evento

El nivel de impacto del maíz *Bt* sobre la mariposa monarca depende del tipo de evento (híbrido comercial). Cada evento utiliza un promotor diferente para controlar la expresión de genes en diferentes partes de la planta; es decir, que los eventos con promotores que expresan las proteínas cry en las hojas o el polen no resultan tóxicos para los insectos objetivo en comparación a los que las expresan

constitutivamente (Gatehouse *et al.*, 2002). Hellmich y colaboradores (2001) evaluaron los riesgos, encontrando que la toxicidad depende de los niveles de exposición al polen a que sea sometida la mariposa monarca, del evento implicado y de los niveles de expresión de la proteína Cry en el polen. Encontraron que sólo los eventos en que se expresaran CryAc o CryAb en el polen eran tóxicos para la especie (Hellmich *et al.*, 2001).

Concentración de la proteína en el polen

El evento 176 presentó 40 veces más endotoxinas CryAb en comparación a los eventos Bt11 y MON810, lo que evidenció el gran diferencial de concentraciones que puede existir entre eventos (Hellmich *et al.*, 2001).

Derramamiento del polen

La reproducción del maíz *Bt* ocurre mediante fertilización cruzada por derramamiento del polen, y es cuando las plantas de algodóncillo que albergan a la mariposa monarca (huevos y larvas, principalmente) se contaminan con el polen transgénico (Westgate, Lizaso, y Batchelor, 2003). Sin embargo el derramamiento del polen depende de varios factores como: la distancia entre la fuente de polen y el algodóncillo; el tamaño, forma y orientación de dicha fuente con respecto al receptor; la intensidad y dirección del viento; entre otras (Della Porta *et al.*, 2008).

Nivel de exposición de la mariposa monarca

Se hizo un estudio donde se obtuvo que la densidad de polen en las hojas superiores (donde se sentaron las masas de huevos) fue sólo del 30-35 % en comparación con las hojas intermedias, donde las densidades de polen fueron significativamente más altas alrededor de la nervadura de la hoja, área evitada por larvas más jóvenes (Pleasant *et al.*, 2001).

Superposición espacio-temporal

Oberhauser y colaboradores (2001) hicieron una importante contribución a la polémica mediante la investigación de la superposición espacial y temporal entre la producción de

polen en plantas de maíz y la etapa larval de la mariposa monarca; encontrando un mayor solapamiento temporal en el norte frente a la parte sur del área de reproducción en verano. En la investigación de Sears y colaboradores (2001) hubo una superposición de tan sólo el 19% en Norteamérica.

CONCLUSIONES

Las investigaciones apresuradas que afirmaron que los cultivos de maíz *Bt* perjudicaban la conservación de la mariposa monarca no se ajustan a la realidad, ya que en ellas se obviaron parámetros como el nivel de exposición de la mariposa al polen y la

superposición espacio-temporal entre ambos, el tipo de evento empleado y la concentración de la toxina en el polen. El tipo de evento es el parámetro más importante porque cada híbrido comercial presenta diferentes concentraciones de la proteína Cry, así como diferentes patrones de expresión en una o varias partes de la planta. La mayoría de eventos no expresan la toxina, y contienen anti-toxinas que evitan que las proteínas Cry resulten tóxicas para insectos no objetivo. Lo que realmente afecta la conservación de *Danaus plexippus* son las malas prácticas de agricultura, que acaban con los lotes de algodoncillo, maleza de la cual se alimentan sus larvas. monarca

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammann, K. (2005). Effects of biotechnology on biodiversity: herbicide-tolerant and insect-resistant GM crops. *Trends in Biotechnology*, 23(8), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.06.008>
- Ammann, K. (2014). Genomic Misconception: a fresh look at the biosafety of transgenic and conventional crops. A plea for a process agnostic regulation. *New Biotechnology*, 31(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.04.008>
- Bravo, A., Gill, S. S., y Soberón, M. (2005). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. *Comprehensive molecular insect science*, 6, 175–205.
- Bravo, A., Gill, S. S., y Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bravo, A., Martínez de Castro, D. L., Sánchez, J., Cantón, P. E., Mendoza, G., Gómez, I., ... Soberón, M. (2015). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins and their use in the control of insect pests. En *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* (pp. 858–873). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800188-2.00030-6>
- Carson, R. (2002). *The Silent Spring* (40ª ed.). Boston - New York: Houghton Mifflin Harcourt. Recuperado a partir de: <https://goo.gl/ctYAhw>
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., ... Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(3), 807–13. Recuperado a partir de <http://mmbbr.asm.org/content/62/3/807.abstract>
- de Maagd, R. A., Bravo, A., y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17(4), 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)
- Della Porta, G., Ederle, D., Bucchini, L., Prandi, M., Verderio, A., y Pozzi, C. (2008). Maize pollen mediated gene flow in the Po valley: Source–recipient distance and effect of flowering time. *European Journal of Agronomy*, 28(3), 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2007.07.009>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2014). Statistics. Recuperado a partir de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2016). AmisStatistics. Recuperado a partir de <http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html>
- Galindo-Leal, C., y Rendón-Salinas, E. (2005). *Danaidas: Las Maravillosas Mariposas Monarca* (Publicació). México D.F: World Wildlife Fund (WWF) - Telcel México. Recuperado a partir de http://www.soymonarca.mx/_pdf/danaidas_maravillosas_mariposas_monarca.pdf
- García-Gómez, B., Sánchez, J., Martínez de Castro, D., Ibarra, J., Bravo, A., y Soberón, M. (2013). Efficient production of *Bacillus thuringiensis* Cry1AMod toxins under regulation of cry3Aa promoter and single cysteine mutations in the protoxin region. *Applied And Environmental Microbiology*, 79(22), 6969–73. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-13>
- Gatehouse, A. M. ., Ferry, N., y Raemaekers, R. J. (2002). The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. *Trends in Genetics*, 18(5), 249–251. [doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02664-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02664-1)
- Girard, F., Vachon, V., Préfontaine, G., Marceau, L., Su, Y., Larouche, G., ... Laprade, R. (2008). Cysteine scanning mutagenesis of alpha4, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Applied and environmental microbiology*, 74(9), 2565–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.00094-08>
- Hartzler, R. G. (2010). Reduction in common milkweed (*Asclepias syriaca*) occurrence in Iowa cropland from 1999 to 2009. *Crop Protection*, 29(12), 1542–1544. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.07.018>
- Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., ... Lewis, L. C. (2001). Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*- purified proteins and pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11925–11930. <https://doi.org/10.1073/pnas.211297698>
- Holst, N., Lang, A., Lövei, G., y Otto, M. (2013). Increased mortality is predicted of *Inachis io* larvae caused by Bt-maize pollen in European farmland. *Ecological Modelling*, 250, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.11.006>
- Jesse, L. C. H., y Obrycki, J. J. (2000). Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125(2), 241–248. Recuperado a partir de <http://link.springer.com/article/10.1007/s004420000502>
- Jesse, L. C. H., y Obrycki, J. J. (2003). Occurrence of *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Danaidae) on milkweeds (*Asclepias syriaca*) in transgenic Bt corn agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 97(1–3), 225–233. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00124-5)
- Lang, A., y Vojtech, E. (2006). The effects of pollen consumption of transgenic Bt maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). *Basic and Applied Ecology*, 7(4), 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.baee.2005.10.003>
- Losey, J. E., Rayor, L. S., y Carter, M. E. (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399(6733), 214. <https://doi.org/10.1038/20338>
- Monarch Watch Org. (2016). No. Recuperado a partir de <http://www.monarchwatch.com>
- Morales Estupiñán, C. (2001). *Las nuevas fronteras tecnológicas: promesas, desafíos y amenazas de los transgénicos*. Santiago de Chile. Recuperado a partir de http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/4490/S018664_es.pdf?sequence=1
- Nelson, G. (2001). Traits and techniques of GMOs. En G. C. Nelson (Ed.), *Genetically modified organisms in agriculture: economics and politics* (pp. 7–14). Cornwall: Academic Press. Recuperado a partir de: <https://goo.gl/11VXqt>
- Oberhauser, K. S., Prysby, M. D., Mattila, H. R., Stanley-Horn, D. E., Sears, M. K., Dively, G., ... Hellmich, R. L. (2001). Temporal and spatial overlap between monarch larvae and corn pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11913–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.211234298>
- Pleasant, J. M., Hellmich, R. L., Dively, G. P., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Mattila, H. R., y Jones,

- G. D. (2001). Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11919–11924.
- Scott, J. A. (1986). *The butterflies of North America. A natural history and field guide*. Stanford University Press. Recuperado a partir de <http://www.cabdirect.org/abstracts/19880546914.html>
- Sears, M. K., Hellmich, R. L., Stanley-Horn, D. E., Oberhauser, K. S., Pleasants, J. M., Mattila, H. R., ... Dively, G. P. (2001). Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: a risk assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11937–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.211329998>
- Soberón, M., Rodríguez-Almazán, C., Muñoz-Garay, C., Pardo-López, L., Porta, H., y Bravo, A. (2012). *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to overcome insect resistance in the field. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.003>
- Stanley-Horn, D. E., Dively, G. P., Hellmich, R. L., Mattila, H. R., Sears, M. K., Rose, R., ... Lewis, L. (2001). Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11931–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.211277798>
- US Environmental Protection Agency [USEPA]. (2001). Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* plant-incorporated protectants. Recuperado a partir de https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/1-overview.pdf
- Walker, K., y Frederick, R. (2011). Entomological Risks of Genetically Engineered Crops. En *Encyclopedia of Environmental Health* (pp. 306–314). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00172-0>
- Westgate, M. E., Lizaso, J., y Batchelor, W. (2003). Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize. *Crop Science*, 43(3), 934–942. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.9340>
- Wisniewski, J.-P., Frangne, N., Massonneau, A., y Dumas, C. (2002). Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie*, 84(11), 1095–1103. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)00014-7)