



INFORME TÉCNICO

“Acciones de Vigilancia y Supervisión en la Región de La Libertad a fin de detectar la posible presencia de cultivos ilegales de maíz transgénico”

COMPONENTE REGULACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

AUTORES:

- Jorge Alcántara Delgado
- Yeny Aquino Villasante
- Jorge Ramírez Urbina
- José Gerardo Zapata Gómez



Del 09 al 12 de octubre del año 2017 se ha realizado una misión de colecta de Material Biológico de maíz en tres (3) Provincias de La Libertad (Ascope, Virú y Trujillo). Se ha recolectado un total de 72 muestras provenientes de campos de cultivo de maíz amarillo duro. Las muestras colectadas fueron remitidas al Laboratorio de Detección de OVM del INIA para los análisis correspondientes.

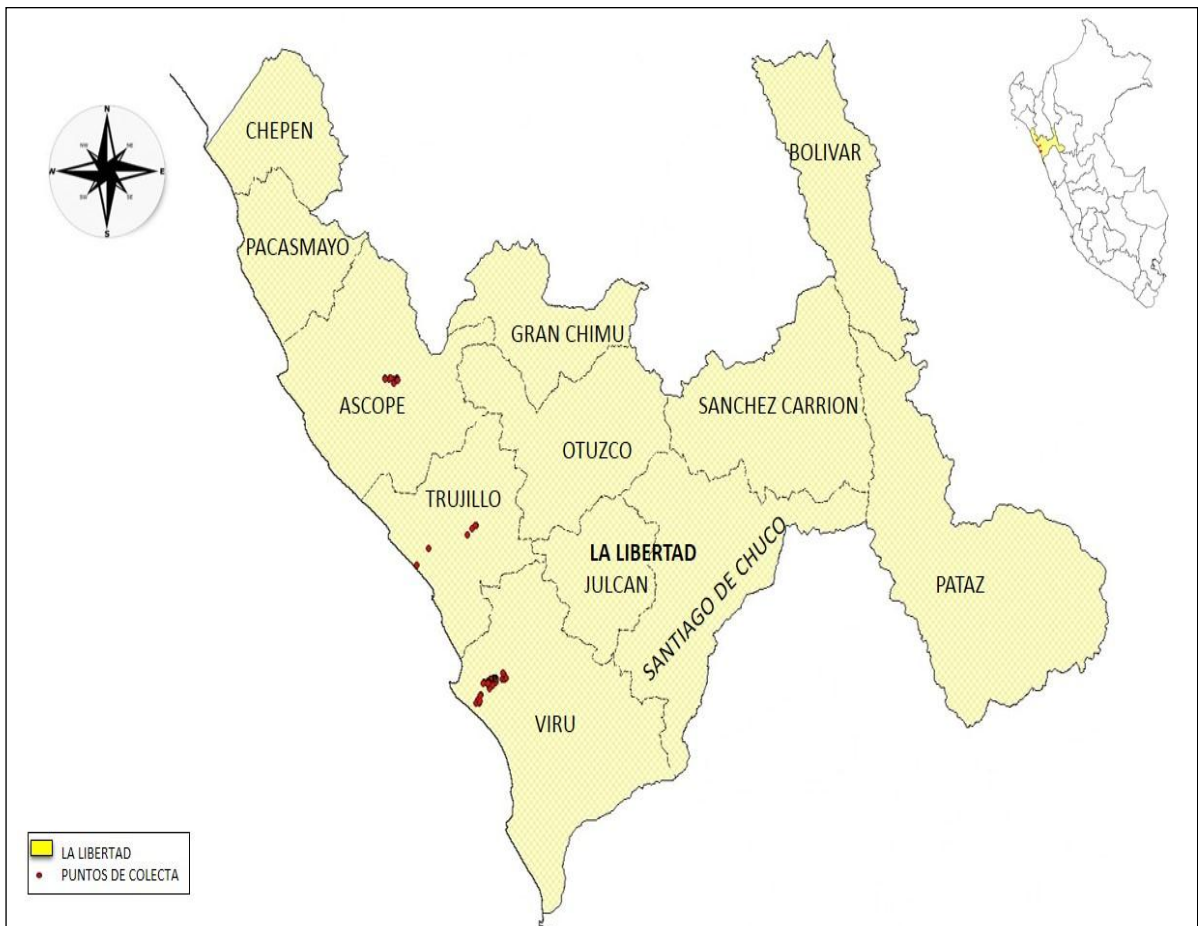
2. OBJETIVOS

a) Detectar cualitativamente la presencia del promotor p35S y la secuencia tnos en muestras de maíz de 72 campos de cultivos de la provincia de la Libertad.

3. ÁREA DE TRABAJO

La colecta de material biológico de maíz fue realizado en la Región de La Libertad. Se muestreo en 4 provincias (Ascope, Virú y Trujillo). Los campos evaluados se visualizan en la Figura 1 y 2 y se detallan en la Tabla 1.

Figura 1. Mapa con los lugares donde se realizaron las labores de colecta en las provincias de la Libertad, región La Libertad.





4. 1. Personal Involucrado:

INSTITUCIÓN	REPRESENTANTE
Instituto Nacional de Innovación Agraria	Jorge Alcántara Delgado
	Yeny Aquino Villasante
	Jorge Ramírez Urbina
	José Gerardo Zapata Gómez

5. MATERIALES y MÉTODOLOGÍA

5.1. Materiales y equipos:

- 1 Camioneta (proporcionada por la E. E. de La Molina del INIA).
- 2 Cámaras fotográficas (proporcionada por el INIA).
- Mapas y Croquis (elaborados por el INIA).
- 2 GPS (proporcionados por el INIA)
- Materiales para la colecta de hojas de maíz (proporcionados por el INIA):
 - Bolsas de papel de 20 x 30 cm.
 - Bolsas de plástico con cierre (zip lock).
 - Caja para hielo (cooler)
 - Tijeras
 - Alcohol
 - Algodón
 - Rótulos y Etiquetas
 - Fichas de registro
 - Cuadernos de campo

5.2. Tamaño de Muestra:

Se consideró al campo de cultivo como unidad experimental. El tamaño de la muestra fue de 50 plantas por campo de cultivo y por cada planta se colectó una porción de la hoja. En total, se obtuvieron 72 muestras de los campos de cultivo evaluados.

5.3. Metodología de Colecta de Hojas en Campo:

Se seleccionaron aleatoriamente los campos de cultivo a evaluar en cada distrito. Se colectaron en promedio 50 hojas por campo de cultivo en una distancia mínima de una hectárea tomando una porción hoja por planta.



Se obtuvo una porción de hoja de aproximadamente 5 cm de longitud, de cada una de las 50 plantas seleccionadas, tomando de preferencia la parte media de las hojas tiernas y sanas.

Posteriormente, se depositaron las 50 porciones de hojas colectadas en 1 bolsa de papel, debidamente rotulada con lápiz, indicando el número de muestra, la zona de colecta, la fecha y el punto GPS. Seguidamente, fueron depositadas en un recipiente conteniendo hielo seco para su posterior conservación a 4° C, hasta el momento de la extracción del ADN.

Finalmente, se tomaron las coordenadas geográficas del campo de cultivo con el GPS (Anexo 1) y el registro fotográfico del campo de cultivo.

Tabla 1. Campos de cultivo evaluados en la región Lima e Ica.

DISTRITO	PROVINCIA	REGIÓN	CAMPOS EVALUADOS
ASCOPE	ASCOPE	LA LIBERTAD	18
TRUJILLO	TRUJILLO	LA LIBERTAD	8
VIRU	VIRU	LA LIBERTAD	46
TOTAL			72

* Los datos de pasaporte de las colectas realizadas se encuentran disponibles en el Anexo 1.

5.4. Metodología de detección de OVM por PCR.

Se realizó el análisis de detección para la presencia de Organismos Vivos Modificados (OVM), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de tipo cualitativa, tiempo final. Se realizó el análisis de PCR de barrido.

El análisis de barrido, cribado o “screening” está basado en la detección por PCR cualitativa del promotor 35S y la secuencia de poliadenilación nos. Estas secuencias están presentes en la mayoría de eventos de maíz transgénico y serán referidas más adelante por los acrónimos p35S y tnos, respectivamente.

5.4.1. Extracción, Cuantificación y preparación del ADN molde

Antes de la extracción del ADN, se limpiaron las hojas de maíz y se cortó un pedazo de las 50 hojas de la muestra. Luego, se procedió a molerlas en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y pilón. Se colocó la muestra pulverizada en un tubo y se le adicionó el tampón AP1. Para la extracción se empleó el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se procedió conforme a lo descrito en el manual de uso.

El ADN extraído fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop 200 (Thermo Scientific), a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ADN fue determinada mediante los ratios de absorbancia a 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm. La calidad del ADN fue visualizada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 %. El ADN extraído fue uniformizado a una concentración de 20 ng/μL aproximadamente, para su posterior empleo en la amplificación por PCR.



5.4.2. Amplificación PCR, Electroforesis y registro de resultados.

A. Análisis de barrido (screening).

Se emplearon 2 repeticiones de cada muestra para los análisis de PCR. Los ensayos PCR múltiplex fueron estandarizados para el análisis de dos pares de iniciadores por reacción (Tabla 2), según las condiciones señaladas en la Tabla 3, con la finalidad de reducir los costos y el tiempo de análisis. El programa de amplificación para el análisis PCR de barrido o “screening” fueron realizados según lo descrito en las Tabla 4.

La PCR fue realizada en un termociclador ProS (Eppendorf). Los iniciadores utilizados fueron sintetizados por la empresa INVITROGEN. Los materiales de referencia certificados corresponden a las empresas AOCS y ERM. Todos los demás reactivos empleados en la amplificación PCR (Buffer PCR 10X, dNTP, MgCl₂, Taq polimerasa) provienen de la empresa KAPA.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para el análisis por PCR.

TIPO DE INICIADOR	INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	ELEMENTO BLANCO	REFERENCIA
Endógeno	ZEIN01	TGCTTGCAATTGTTGCTCTCCTAG	329	Gen <i>zeína</i>	Chiueh et al., 2002 ⁽⁴⁾ ; Rahman et al., 2007 ⁽⁵⁾ ; GMDD ⁽⁶⁾ .
	ZEIN02	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT			
Screening	P35SL	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	195	Promotor 35S	Lin et al., 2000 ⁽⁷⁾ ; GMDD ⁽⁶⁾ .
	P35SU	GCTCCTACAAATGCCATCA			
	tnos F	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG	151	Secuencia de poliadenilación <i>nos</i>	GMDD ⁽⁶⁾ ; Lee et al., 2004 ⁽⁸⁾ .
	tnos R	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT			



Tabla 3. Condiciones de la mezcla PCR multiplex para el análisis de barrido.

Componente del Buffer de Reacción	P35S	tnos
	Concentración Final	Concentración Final
Tampón PCR	1.00 X	1.00 X
dNTPs	0.30 mM	0.22 mM
MgCl ₂	1.50 mM	1.50 mM
Iniciador directo para el gen <i>zeína</i>	0.25 µM	0.25 µM
Iniciador reverso para el gen <i>zeína</i>	0.25 µM	0.25 µM
Iniciador directo para la secuencia específica	0.35 µM	0.25 µM
Iniciador reverso para la secuencia específica	0.35 µM	0.25 µM
Taq Hot Start	0.60 U	0.50 U

Tabla 4: Programas de Amplificación PCR multiplex para el análisis de barrido

FASE PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Predenaturación	95	360	1
Denaturación	94	30	
Alineamiento	60	45	40
Extensión	72	30	
Extensión final	72	420	1

Tanto para todos los ensayos de amplificación PCR, como para el análisis de los productos de amplificación por electroforesis, se utilizaron los controles que se detallan a continuación:

- **Controles positivos:** BT11: Material de Referencia Certificado, ERM (European Reference Materials). Empleado en los análisis PCR de barrido, concentración del 1,0 % y 0,1 %.
- **Control de la amplificación del ADN:** Gen *zeína* (329 pb).
- **Control negativo:** Maíz amarillo duro (variedad proporcionada por el INIA)
- **Blanco:** Master mix PCR sin ADN.



B. Electroforesis y Registro de Resultados.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,8 % (90 voltios x 90 minutos) y visualizados por tinción con Gel Red (Concentración en muestra: 1,2 X) y registrados con el fotodocumentador Gel Doc TM XR+System (BIORAD).

El tamaño del producto amplificado de las muestras analizadas para cada uno de los iniciadores, así como los controles positivos, fueron comparados con la escalera de fragmentos de ADN (ladder) de 50 pb (Fermentas: 1031 pb a 50 pb).

Finalmente, se realizó el registro de la presencia o ausencia del producto de amplificación para las regiones p35S y tnos, para su incorporación en una base de datos.

6. RESULTADOS.

6.1. Extracción, cuantificación y preparación del ADN molde

Se obtuvo un total de 71 muestras de ADN extraído a partir de las hojas provenientes de los 72 campos de cultivo que fueron remitidos al Laboratorio de Detección de OVM del INIA, cuyas concentraciones estuvieron en el rango de 21,8 ng/ μ L a 206,5 ng/ μ L. Adicionalmente, se extrajo ADN de granos de Maíz amarillo duro INIA 611, como control negativo.

6.2. Amplificación PCR, electroforesis y registro de resultados.

6.2.1. Detección de las secuencias p35S y tnos.

De las 72 muestras provenientes de campos de cultivo que amplificaron para la región del gen endógeno de maíz, ninguna de las muestras amplificaron positivamente para la región p35S y tnos en las 2 repeticiones de los ensayos realizados.

7. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, el INIA ha realizado 4 acciones de supervisión e inspección de campos de cultivo en la región Lima, a fin de detectar e identificar la presencia de cultivos de maíz genéticamente modificado. Las dos primeras acciones de supervisión e inspección fueron realizadas en la provincia de Barranca en el 2009 y 2013, la tercera realizada en el 2016 fue en la provincia de Cañete; y la última en la Región de la Libertad, año 2017.

Las 71 muestras de ADN, correspondientes a los campos de cultivo de maíz analizados, fueron obtenidas con la calidad y concentración adecuadas, lo cual permitió la realización del análisis PCR de "screening" para la detección de las secuencias p35S y tnos. Ello se corrobora por la amplificación del gen endógeno zeína en todas las muestras analizadas.



De acuerdo a nuestros resultados no se ha detectado, en el análisis PCR, ninguna de las secuencias en escrutinio. Ello permitiría descartar la presencia de cultivos de maíz transgénico en la Región de La Libertad, según el ámbito operativo de las muestras obtenidas y analizadas.

8. CONCLUSIONES

- No se ha detectado la presencia de la secuencia de origen transgénico p35S y tnos en los 72 campos cultivados con maíz amarillo duro, muestreados en la Región de La Libertad.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clive, J. 2015. 20th Anniversary of the Global Commercialization of Biotech Crops (1996 to 2015) and Biotech Crop Highlights in 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, Nueva York.
2. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio. 2016. <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial> .
3. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - ISAAA. GM database approval. <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=395>.
4. Chiueh, L.; Y. Chen y D. Yang-Chih Shih. 2002. Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed foods. Journal of Food and Drug Analysis. Vol. 10 (1): 25-33.
5. Rahman, T.; E. H. Chowdhury; A. C. Mondol; M. M. Hoque y K. M. Nasiruddin. 2007. Detection of maize intrinsic and recombinant Cry1Ab gene fragment in genetically modified maize. Plant Tissue Cult. and Biotech. 17 (1): 103-108.
6. GMO Detection Method Database (GMDD), GMO Detection Laboratory, Shanghai Jiao Tong University. www.gmdd.shgmo.org
7. Lin, H., L. Chiueh, and D. Shih. 2000. Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize by the Polymerase Chain Reaction Method. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 8, No. 3, 2000, Pages 200-207.
8. Lee Yong-Hwan Park, S.; J, Kim; K. Park y Y. Kim. 2004. Qualitative PCR method for detection of genetically modified maize lines NK603 y TC1507. Agric. Chem. Biotechnol. 47 (4): 185-188.



NORMAS LEGALES CITADAS

- **Ley N° 29811.** Ley que establece la Moratoria al Ingreso y Producción de Organismos Vivos Modificados al territorio nacional por un período de 10 años. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú. 09 de diciembre del 2011.
- **Decreto Supremo 008-2012-MINAM.** Aprueban Reglamento de la Ley que establece la Moratoria al Ingreso y Producción de Organismos Vivos Modificados al Territorio Nacional por un período de 10 años. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú. 14 de noviembre del 2012.
- **Decreto Supremo N° 011-2011-AG.** Dictan normas sobre seguridad de la biotecnología en el desarrollo de actividades con organismos vivos modificados agropecuarios o forestales y/o sus productos derivados. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú. 19 de octubre del 2011.
- **Ley N° 27104.** Ley de Prevención de riesgos derivados del uso de la Biotecnología. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú. 12 de mayo de 1999.
- **Decreto Supremo N° 108-2002-PCM.** Aprueban Reglamento de la Ley de Prevención de riesgos derivados del uso de la Biotecnología. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú. 28 de octubre del 2002.

**Anexo 1**

Datos de Pasaporte de las muestras de campos de cultivo maíz colectadas en la región de La Libertad.

Código de Colecta	Código de Laboratorio	Posición	Distrito	Provincia	Región
Campo 1 - 09/10/2017	M03-2017	S8,06091 W78,85528	Santa Rosa	La Libertad	La Libertad
Campo 2 - 09/10/2017	M04-2017	S8,06075 W78,85423	Santa Rosa	La Libertad	La Libertad
Campo 3 - 09/10/2017	M05-2017	S8,06045 W78,85509	Santa Rosa	La Libertad	La Libertad
Campo 4 - 09/10/2017	M06-2017	S8,06869 W78,86546	Quirihuac	La Libertad	La Libertad
Campo 5 - 09/10/2017	M07-2017	S8,08239 W78,87966	Quirihuac	La Libertad	La Libertad
Campo 6 - 09/10/2017	M08-2017	S8,11439 W79,00132	Laredo	La Libertad	La Libertad
Campo 7 - 09/10/2017	M09-2017	S8,11383 W79,00183	Laredo	La Libertad	La Libertad
Campo 8 - 09/10/2017	M10-2017	S8,15347 W79,03705	Laredo	La Libertad	La Libertad
Campo 9 - 10/10/2017	M11-2017	S8,4334W78,7996	Huancaco Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 10 - 10/10/2017	M12-2017	S8,42819 W78,79256	Huancaco Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 11 - 10/10/2017	M13-2017	S8,43448 W78,80141	Huancaco Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 12 - 10/10/2017	M14-2017	S8,44159 W78,81107	Huancaco Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 13 - 10/10/2017	M15-2017	S8,45738 W78,83845	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 14 - 10/10/2017	M16-2017	S8,45713 W78,83866	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 15 - 10/10/2017	M17-2017	S8,4571 W78,83963	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 16 - 10/10/2017	M18-2017	S8,45937 W78,84063	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 17 - 10/10/2017	M19-2017	S8,46994 W78,84828	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 18 - 10/10/2017	M20-2017	S8,47668 W78,85321	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 19 - 10/10/2017	M21-2017	S8,47613 W78,8437	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 20 - 10/10/2017	M22-2017	S8,4712 W78,84234	huancaquito	La Libertad	La Libertad
Campo 21 - 10/10/2017	M23-2017	S8,4177 W78,79223	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 22 - 10/10/2017	M24-2017	S8,41804 W78,79236	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 23 - 10/10/2017	M25-2017	S8,41968 W78,79319	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 24 - 10/10/2017	M26-2017	S8,4186 W78,79664	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 25 - 10/10/2017	M27-2017	S8,41847 W78,79781	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 26 - 10/10/2017	M28-2017	S8,41841 W78,79847	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 27 - 10/10/2017	M29-2017	S8,41895 W78,79884	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad



Subdirección de Regulación de la Innovación Agraria
Dirección de Gestión de la Innovación Agraria
Instituto Nacional de Innovación Agraria

Campo 28 - 10/10/2017	M30-2017	S8,4194 W78,79936	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 29 - 10/10/2017	M31-2017	S8,42034 W78,80539	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 30 - 10/10/2017	M32-2017	S8,41977 W78,80581	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 31 - 10/10/2017	M33-2017	S8,42067 W78,80811	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 32 - 10/10/2017	M34-2017	S8,42056 W78,80989	Chaquin Bajo	La Libertad	La Libertad
Campo 33 - 11/10/2017	M35-2017	S8,42154 W78,77355	Viru	La Libertad	La Libertad
Campo 34 - 11/10/2017	M36-2017	S8,4201 W78,76681	Viru	La Libertad	La Libertad
Campo 35 - 11/10/2017	M37-2017	S8,41712 W78,76095	Viru	La Libertad	La Libertad
Campo 36 - 11/10/2017	M38-2017	S8,40776 W78,76941	Viru	La Libertad	La Libertad
Campo 37 - 11/10/2017	M39-2017	S8,40664 W78,77009	Viru/San Isidro	La Libertad	La Libertad
Campo 38 - 11/10/2017	M40-2017	S8,42523 W78,81566	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 39 - 11/10/2017	M41-2017	S8,4254 W78,8158	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 40 - 11/10/2017	M42-2017	S8,42541 W78,81636	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 41 - 11/10/2017	M43-2017	S8,4261 W78,81651	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 42 - 11/10/2017	M44-2017	S8,42784 W78,82926	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 43 - 11/10/2017	M45-2017	S8,42807 W78,8294	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 44 - 11/10/2017	M46-2017	S8,42932 W78,83095	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 45 - 11/10/2017	M47-2017	S8,42965 W78,8312	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 46 - 11/10/2017	M48-2017	S8,42885 W78,81734	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 47 - 11/10/2017	M49-2017	S8,42924 W78,81687	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 48 - 11/10/2017	M50-2017	S8,42954 W78,81748	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 49 - 11/10/2017	M51-2017	S8,42983 W78,81767	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 50 - 11/10/2017	M52-2017	S8,42899 W78,8182	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 51 - 11/10/2017	M53-2017	S8,43117 W78,81788	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 52 - 11/10/2017	M54-2017	S8,43072 W78,8174	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 53 - 11/10/2017	M55-2017	S8,432 W78,81749	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 54 - 11/10/2017	M56-2017	S8,4326 W78,81801	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 55 - 11/10/2017	M57-2017	S8,4315 W78,81709	Santa Elena	La Libertad	La Libertad
Campo 56 - 12/10/2017	M58-2017	S7,71811 W79,11119	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 57 - 12/10/2017	M59-2017	S7,71848 W79,1109	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 58 - 12/10/2017	M60-2017	S7,71928 W79,11048	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 59 - 12/10/2017	M61-2017	S7,72734 W79,10858	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 60 - 12/10/2017	M62-2017	S7,72724 W79,10784	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 61 - 12/10/2017	M63-2017	S7,71712 W79,12151	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 62 - 12/10/2017	M64-2017	S7,71688 W79,12115	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 63 - 12/10/2017	M65-2017	S7,71744 W79,12248	Ascope	La Libertad	La Libertad



Subdirección de Regulación de la Innovación Agraria
Dirección de Gestión de la Innovación Agraria
Instituto Nacional de Innovación Agraria

Campo 64 - 12/10/2017	M66-2017	S7,717 W79,13435	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 65 - 12/10/2017	M67-2017	S7,71743 W79,13525	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 66 - 12/10/2017	M68-2017	S7,71523 W79,11713	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 67 - 12/10/2017	M69-2017	S7,71674 W79,09885	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 68 - 12/10/2017	M70-2017	S7,71745 W79,09867	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 69 - 12/10/2017	M71-2017	S7,71855 W79,09855	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 70 - 12/10/2017	M72-2017	S7,71916 W79,0985	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 71 - 12/10/2017	M73-2017	S7,71995 W79,09833	Ascope	La Libertad	La Libertad
Campo 72 - 12/10/2017	M74-2017	S7,72148 W79,09649	Ascope	La Libertad	La Libertad