

# INVESTIGACIONES SOBRE LA PRESENCIA DE TRANSGENES EN PERÚ: CASO MAÍZ (*Zea mays* L.)

Gutiérrez-Rosati, A.; Poggi, P.D.; Gálvez, G.M.; Cáceres, R.R.

Universidad Nacional Agraria La Molina, Departamento de Biología, Avenida La Molina S/N;  
[antonieta@lamolina.edu.pe](mailto:antonieta@lamolina.edu.pe)

## RESUMEN

El maíz es una especie alógama, por ello la presencia de maíz transgénico colindante a un campo de maíz convencional, sin una polinización controlada, ocasiona la contaminación de la plantación no transgénica.

La producción nacional de maíz amarillo duro en Perú no cubre la demanda interna, importándose la diferencia desde Argentina en un 80% y de Estados Unidos en casi un 20%, ambos países productores de maíz transgénico.

Para la detección de transgénicos debe contarse con metodologías suficientemente sensibles, reproducibles, de corto tiempo y bajo costo, para permitir su uso confiable y de rutina.

El presente trabajo tuvo por objetivo estandarizar la metodología de detección de transgenes de maíz amarillo duro utilizando el método de PCR Multiplex,

Luego de analizar 58 muestras se detectó la presencia de los eventos:

NK603: Maíz Roundup Ready; resistente al herbicida Glyphosato.

Bt11: resistente al gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*); tolerante al herbicida phosphinothricin (PPT) (glifosinato de amonio).

Ambos para alimentación humana o animal, pertenecen a las compañías Monsanto y Syngenta respectivamente.

Se recomienda continuar con el monitoreo en el Perú, incorporando en el muestreo y análisis semillas presentes en el mercado y brindar recomendaciones técnico-Políticas a fin de asegurar la sustentabilidad de los agroecosistemas.

## PALABRA CLAVES

Maíz; Organismos Vivo Modificados; Organismos Genéticamente Modificados; Bioseguridad; transgenes; Perú.

## INTRODUCCION

El maíz es uno de los cultivos más importantes del mundo. En el Perú se conocen 56 razas locales (Gutiérrez-Rosati, 2006) distribuidas principalmente en la sierra (Sevilla, 2005). A nivel nacional el maíz es el cultivo de mayor área sembrada, siendo el más importante el maíz amarillo duro, para alimento en la avicultura y porcicultura. La producción nacional de maíz satisface solo la mitad de su demanda por lo que es necesario importarlo de Argentina en un 80% y el resto de Estados Unidos y otros países. Es conocido que estos dos principales países proveedores producen primordialmente maíz transgénico (Sevilla, 2005; Gutiérrez-Rosati 2006).

Un organismo transgénico u organismo vivo modificado (OVM) es definido en el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad como “cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna, la misma que comprende técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional”.

El área global sembrada con cultivos transgénicos se ha incrementado cerca de 67 veces entre 1996 y el 2007 (de 1.7 a 114.3 millones de hectáreas y se espera que continúe creciendo (James, 2007). Este incremento de volúmenes de producción, como es lógico incide sobre las preocupaciones de bioseguridad, especialmente a nivel de los consumidores. Estas preocupaciones son atendidas a través de una política de etiquetado la cual requiere el desarrollo de métodos de detección fiables.

Los métodos de detección más usados se pueden agrupar en dos estrategias: la primera es detectando la proteína expresada por el gen introducido a través de su anticuerpo específico (Bonfini, 2001). Un segundo método es detectando la secuencia de ADN usada para la modificación genética mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (James, 2003), la detección por PCR es uno de los más utilizados, por permitir detectar

pequeñas cantidades de OGM en materiales crudos y alimentos procesados (Germini, 2004). Las variantes más utilizadas dentro de los métodos PCR, son la PCR Multiplex y en tiempo real.

La PCR Multiplex es una variación de la técnica convencional que se caracteriza por amplificar dos o más secuencias de ADN simultáneamente en una misma reacción permitiendo reducir los costos y aumentar la flexibilidad del método (James, 2003). La PCR en tiempo real evalúa la amplificación de la secuencia de interés durante toda la reacción monitoreando indirectamente la formación de producto y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN pudiendo estimar un porcentaje de ADN transgénico (Bonfini, 2001).

En la detección de organismos genéticamente modificados (OGM) la técnica más recomendada y actualmente aplicada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, por ser muy sensible, reproducible y requerir pequeñas cantidades de muestra.

Pietsch *et al.*, (1997) desarrollaron el primer método para detectar OGM detectando la secuencia del promotor "35S" del virus mosaico de la coliflor (P35S) y el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS), ambos comunes en la mayoría de OGM de ese tiempo.

Los métodos de detección basados en iniciadores genéricos solo podían detectar un OGM pero no identificarlo, por lo que se desarrollaron métodos de PCR utilizando iniciadores específicos para elementos en cada tipo de OGM. Se desarrollaron métodos para: MON 810 (Holck *et al.* (2002), Pla *et al.* (2003) y La Paz *et al.* (2007)); MON 863 (Pan *et al.* (2006) y Yang *et al.* (2005)); Bt11 (Ronning *et al.* (2003) y Zimmermann *et al.* (2000)); GA21 (Hernández *et al.* (2004)); NK603 (Nielsen *et al.* (2004)) y T25 (Weighardt *et al.* (2004), Collonnier *et al.* (2005)). Estos hacen uso del PCR en tiempo real que detecta y cuantifica la presencia de OGM.

Matsuoka *et al.* (2000) desarrollaron un método de detección simultáneo de cuatro líneas genéticamente modificadas (GM) de maíz utilizando PCR Multiplex. Utilizaron iniciadores oligonucleótidos específicos para: Bt11, Event176, MON810 y LIBERTY, amplificando un segmento con parte de una secuencia exógena introducida y parte de una secuencia intrínseca del maíz.

Conforme se introducen al mercado nuevas variedades de maíz GM, los métodos de detección por PCR Multiplex fueron incorporando nuevos iniciadores para cada nuevo evento. Matsuoka *et*

*al.* (2001) reportaron un método para detectar simultáneamente cinco eventos de maíz GM como: Bt11, Event176, GA21, MON810 y T25. James *et al.* (2003) introdujeron un método capaz de detectar OGM de maíz como: event176, Bt11, Mon810 y T14/25; de canola como: GT73, HCN92/28, MS8/RF3 y Oxy 235; y de soya el evento Roundup Ready. Germini *et al.* (2004) desarrollaron un método para detectar cuatro eventos de maíz GM como: MON810, Bt11, Nt 176 y GA21; y para detectar soya GM Roundup Ready.

Onishi *et al.* (2005) desarrollaron un método para detectar simultáneamente ocho eventos transgénicos en una misma reacción mediante PCR Multiplex. Diseñaron iniciadores específicos para los constructos transgénicos utilizando secuencias de ADN recombinante de dominio público encontradas en el "Data Bank of Japan" de manera que un iniciador de cada par fue diseñado para hibridarse a un gen que confiere un carácter transgénico y el otro para hibridarse a otro elemento artificial junto al gen del carácter transgénico. Cada iniciador permitió que cada producto de amplificación sea distinto para cada evento transgénico pudiendo visualizar las distintas bandas de productos amplificados en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. El método permitió detectar una mezcla de maíces transgénicos conteniendo 0.25% de cada uno.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo reproducible que haciendo uso de del método de detección PCR Multiplex que permitiera discriminar material de maíz transgénico y no transgénico, incluyendo la identificación del evento presente en la muestra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para fines de la investigación se trabajó con frutos de maíz amarillo duro (grano) procedentes de varias localidades en Perú. Ver el Cuadro N° 1.

CUADRO N° 1. RELACIÓN DE MUESTRAS PROCEDENTES DE DIFERENTES LOCALIDADES

| Código interno Lab. | Lugar de origen (valle) | Código interno Lab. | Lugar de origen (valle) |
|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| M01                 | Nacional                | M30                 | Barranca                |
| M02                 | Grano importado         | M31                 | Barranca                |
| M03                 | Grano importado         | M32                 | Nacional                |
| M04                 | Grano importado         | M33                 | Chimbote                |
| M05                 | Grano importado         | M34                 | Chimbote                |
| M06                 | Grano importado         | M35                 | Buena Vista - Casma     |
| M07                 | Barranca                | M36                 | Barranca                |
| M08                 | Barranca                | M37                 | Chimbote                |
| M09                 | Nacional                | M38                 | Buena Vista - Casma     |
| M10                 | Nacional                | M39                 | Barranca                |
| M11                 | Barranca                | M40                 | Chimbote                |
| M12                 | Nacional                | M41                 | Barranca                |

|     |          |     |                 |
|-----|----------|-----|-----------------|
| M13 | Barranca | M42 | Barranca        |
| M14 | Barranca | M43 | Barranca        |
| M15 | Nacional | M44 | Barranca        |
| M16 | Nacional | M45 | Barranca        |
| M17 | Barranca | M46 | Huaura          |
| M18 | Chimbote | M47 | Moro - Ancash   |
| M19 | Barranca | M48 | Barranca        |
| M20 | Barranca | M49 | Casma- Chimbote |
| M21 | Barranca | M50 | Barranca        |
| M22 | Barranca | M51 | Ancash          |
| M23 | Nacional | M52 | Barranca        |
| M24 | Barranca | M53 | Barranca        |
| M28 | Barranca | M54 | Santa- Ancash   |
| M29 | Barranca | M56 | Moro - Chimbote |

Para propósitos de la presente publicación, se hará referencia a los resultados obtenidos de las 25 muestras correspondientes a cosechas del año 2007, provenientes de agricultores del valle de Barranca, Provincia de Barranca Departamento de Lima. Ver el Cuadro N° 2.

CUADRO N° 2. RELACIÓN DE MUESTRAS PROCEDENTES DEL VALLE DE BARRANCA

| Muestra | Código laboratorio | Procedencia | Muestra | Código laboratorio | Procedencia |
|---------|--------------------|-------------|---------|--------------------|-------------|
| 1       | M 08               | Barranca    | 14      | M 31               | Barranca    |
| 2       | M 11               | Barranca    | 15      | M 36               | Barranca    |
| 3       | M 13               | Barranca    | 16      | M 39               | Barranca    |
| 4       | M 14               | Barranca    | 17      | M 41               | Barranca    |
| 5       | M 17               | Barranca    | 18      | M 42               | Barranca    |
| 6       | M 19               | Barranca    | 19      | M 43               | Barranca    |
| 7       | M 20               | Barranca    | 20      | M 44               | Barranca    |
| 8       | M 21               | Barranca    | 21      | M 45               | Barranca    |
| 9       | M 22               | Barranca    | 22      | M 48               | Barranca    |
| 10      | M 24               | Barranca    | 23      | M 50               | Barranca    |
| 11      | M 28               | Barranca    | 24      | M 52               | Barranca    |
| 12      | M 29               | Barranca    | 25      | M 53               | Barranca    |
| 13      | M 30               | Barranca    |         |                    |             |

Las muestras fueron tomadas luego del acopio de las cosechas en las zonas de producción de maíz amarillo duro en Barranca. Se muestreo al azar, por succión, en cinco zonas del lote de

acopio, de aproximadamente 30 Tm. Cada succión extrajo cinco kilos de muestra, formando una muestra compuesta de 25 kilos, la cual luego de ser homogenizada se separó un kilo para ser remitida al laboratorio.

A su recepción, se registraron los datos de procedencia y se le otorgo a cada muestra un código del laboratorio.

Adicionalmente se recibieron muestras tomadas al azar del lote de importación de maíz en grano, procedentes de EEUU y Argentina. Dicho material ingresó a Perú para uso en la industria.

### Primers utilizados en la identificación de transgenes

#### I. Primers genéricos para P35S y Zeina:

CMV P35S: cm01 (5'-CACTACAAATGCCATCAT TGCGATA-3') y  
 cm02 (5'-CTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCGA-3')

Gen de la proteína Alfa Zeina: Ze1 (5'TGCTTGCATTGTTGCTCTCCTAG3') Y  
 Ze2 (5'GTCGCAGTGACATTGTGGCAT3')

Los primers fueron sintetizados por la empresa EUROGENTEC S.A. – SERAAINING BELGIUM y resuspendidos en buffer TE y llevados a una concentración de 100 uM.

#### II. Primers para el PCR Multiplex: figuran en el Cuadro N° 3.

CUADRO N° 3. PRIMERS UTILIZADOS PARA EL PCR Multiplex

| Evento   | Nombre      | Secuencia                 | Especificidad (sentido/antisentido) | Ampliación (pb) | Enzima de Restricción/ producto de digestión |
|----------|-------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------|--|
| NK603    | M810 1-5'   | GAGTTTCCTTTTTGTTGCTCTC    | hsp70 int.                          | 444             | XbaI   |
|          | NK603 1-3'  | GCTGCTTGCACCGTGAAG        | cp-4 epsps                          |                 | (174pb/270pb)                                |
| Event176 | E176 1-5'   | GTAGCAGACACCCCTCTCCACA    | PEPC pro.                           | 343             | BsTEII                                       |
|          | cryIA 1-3'  | TCGTTGATGTTKGGGTTGTTGTTTC | cryIA(b)                            |                 | (91pb/252pb)                                 |
| T25      | T25 2-5'    | GGCATGATGTTGGTTTTGGCAAAG  | pat                                 | 311             | SfiI   |
|          | T25 2-3'    | AATTCGAGCTCGGTACCCCT      | pUC18                               |                 | (59pb/252pb)                                 |
| GA21     | GA21 1-5'   | ACGGTGAAGAGTTCAATGTATG    | OTP                                 | 270             | SfiI   |
|          | GA21 1-3'   | TCTCCTTGATGGGCTGCA        | m-epsps                             |                 | (114pb/156pb)                                |
| MON863   | M863 1-5'   | GATGACCTGACCTACCAGA       | cry3Bb1                             | 234             | EcoRI  |
|          | M863 1-3'   | GCACACACATCAACCAAATT      | tahsp17                             |                 | (171pb/63pb)                                 |
| MON810   | M810 1-5'   | GAGTTTCCTTTTTGTTGCTCTC    | hsp70 int                           | 199             | BsaAI  |
|          | cryIA 1-3'  | TCGTTGATGTTKGGGTTGTTGTTTC | cryIA(b)                            |                 | (83pb/116pb)                                 |
| SSIIb    | SSIIb 1-5'  | CTCCAATCCTTTGACATCTGC     | SSIIb                               | 151             |  |
|          | SSIIb 1-3'  | TCGATTTCTCTTGGTGACAGG     | SSIIb                               |                 |  |
| TC1507   | TC1507 1-5' | TTGACAGGTTTGAGTTGATCCAG   | cryIFa2                             | 131             | HindIII                                      |
|          | TC1507 1-3' | CCAAGAACTCATGTTAGTCGCAA   | 3'-poliA                            |                 | (65pb/66pb)                                  |
| Bt11     | Bt11 1-5'   | CCATTTTCAGCTAGGAAGTTC     | adh1-1S-IVS6                        | 110             | XbaI   |

|            |                           |          |             |
|------------|---------------------------|----------|-------------|
| cryIA 1-3' | TCGTTGATGTTKGGGTTGTTGTTTC | cryIA(b) | (72pb/38pb) |
|------------|---------------------------|----------|-------------|

Fuente: Onishi, M; Matsuoka, T; Kodama, T; et al. 2005

Los primers fueron sintetizados por la empresa Invitrogen life technologies - Carlsbad, CA 92008 USA y diluidos en buffer TE a una concentración de 100 uM.

### Estandarización PCR Multiplex:

Se procedió a estandarizar las condiciones de Amplificación, planteando experimentos con las variables:

|                                      |                             |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Concentración de ADN:                | 50ng; 75ng; 125ng; 175ng.   |
| Concentración de dNTP's:             | 0.2mM, 0.25mM y 0.3mM       |
| Concentración de MgCl <sub>2</sub> : | 1.5mM y 2.5mM, 3.5mM; 4.5mM |
| Concentración de Taq polimerasa:     | 0.5U, 1U, 2U.               |

Para todos los experimentos se utilizaron tres repeticiones.

El proceso de estandarización contempló en primer lugar el uso del primer SSIIb, por ser este común y único para el maíz. Luego se procedió a corroborar y ajustar los parámetros para los ocho primers remanentes. Estos experimentos permitieron generar un protocolo estandarizado.

### Preparación del material vegetal

Conformación de la muestra para extracción de ADN: Del kilo de muestra inicial se tomaron 150 gr, se lavaron los granos con abundante agua de caño, y se enjuagaron con agua destilada estéril., para luego secarse en horno a 30 grados centígrados durante 12 horas.

Molienda: Los granos limpios fueron licuados, el polvo o harina, es lo que representa la MUESTRA experimental.

Para cada muestra se utilizaron diferentes cuchillas de licuado y vasos contenedores.

### Extracción de ADN

Se evaluaron cinco protocolos de extracción de ADN:

1. Método mediante kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit de Qiagen;
2. Método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) modificado; (Doyle Y Doyle BRL Focus 12: 13-15 1990).
3. Método del acetato de potasio modificado (Dellaporta. S.L. Word, J. and Hicks, J.B. 1983).
4. Método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Murray, M.G y Thompson, W.F. 1980).
5. Método kit mini plant Qiagen

### Extracción de ADN para uso en PCR Multiplex

#### Muestreo y Extracción ADN

Se adoptó un método estadístico basado en una estadística binomial inversa, para lo cual por cada muestra de 1kg se tomaron 10 pooles de 40 semillas cada uno (aprox. 14 g).

Cada pool de 40 semillas fue molido durante 90 segundos, tomándose luego 150 mg del molido en microtubos de 1.5 ml. Procediéndose a extraer el ADN siguiendo el protocolo seleccionado en los experimentos de estandarización.

[Se agregó 700  $\mu$ L de buffer de lisis (50 mM tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; 10 mM 2-mercaptoethanol; 1% SDS). Se incubó la suspensión durante 10 minutos a 65°C. Se agregaron 200  $\mu$ L de acetato de potasio 5M incubándose en hielo durante 10 minutos, seguido de una centrifugación a 14 000 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 400  $\mu$ L de isopropanol seguido de una centrifugación a 2 000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en alcohol de 70°, se centrifugó a 2 000 rpm por 10 minutos. Después se secó el pellet en estufa a 37°C por 10 minutos. Se resuspendió el ADN en 100  $\mu$ L de buffer TE y se almacenó a -20°C.]

#### **Cuantificación de ADN**

La cuantificación de ADN se hizo a través de lectura espectrofotométrica y a través de lectura directa del gel con ayuda del programa "Quantity One" 4.6.2 de Biorad, Este último procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se cargó un gel de agarosa 0.7% que contenga en uno de los pocillos 10  $\mu$ L de un marcador cuyos fragmentos son de tamaño y concentración conocidos (ADN del fago lambda digerido con la enzima Hind III a una concentración de 0.045 $\mu$ g/ $\mu$ L) y en los otros pocillos 3  $\mu$ L de muestras de ADN por determinar su concentración. Se corre el gel a 250V por 15 minutos en buffer SB 1X (Borato de Sodio 5mM).

Se determina la concentración de ADN de las muestras, comparando la intensidad de las bandas vistas bajo luz UV con respecto a la intensidad generada por las bandas estándar o de concentración conocida. Haciendo uso del programa informático para cuantificación, la concentración del ADN puede ser expresada en  $\mu$ g ADN/ $\mu$ L de muestra.

#### **Detección de transgénicos utilizando primers genéricos para P35S y Zeína**

La detección de eventos transgénicos se puede realizar mediante un análisis cualitativo haciendo uso de la amplificación del ADN por PCR, utilizando "primers" específicos para el gen Zeína, endógeno del maíz y una región del "cassette" utilizado en la transformación genética, por ejemplo aquel que corresponde al promotor P35S del virus del mosaico de la coliflor (CMV).



De esta forma, si un maíz es transgénico presentará la banda tanto para Zeína (329 pb) como para P35S (220 pb).

A fin de evaluar éste método, se procedió a la estandarización de los protocolos a nivel del laboratorio. Uno de ellas fue el determinar la concentración de “primers”. Para esto se utilizaron muestras de Grano importado a fin de determinar si ésta contenía granos transgénicos.

Una vez estandarizado el procedimiento con la muestra de grano importado se analizaron muestras de granos de procedencia nacional.

### Confección de Marcadores Moleculares Específicos

**Marcador de tres bandas:** A fin de tener bandas del tamaño adecuado que permitiera identificar los eventos que se encuentran en rangos entre 100 y 400 pb, se procedió a elaborar un marcador utilizando los productos de amplificación de Zeína, P35S y SSIIb. Obteniéndose un marcador que otorga tres bandas de 329 pb, 220 pb y 150 pb

**Marcador de cuatro bandas:** Luego de detectar el evento Nk603 en la muestra importada de maíz cuyo peso es de 444 pb, se utilizó el producto de amplificación de dicho evento incorporándolo al marcador de tres bandas a fin de disponer de un marcador de cuatro bandas de: 444 pb, 329 pb, 220 pb y 150 pb.

Control + : ADN de grano importado una vez que este fue determinado como transgénico.

Control - : Agua miliQ estéril sin ADN.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción de ADN

Luego de analizar el rendimiento, la limpieza de las muestras de ADN obtenidas mediante los cinco diferentes protocolos de extracción recomendados en la literatura, se pudo observar que el método de extracción basado en acetato de amonio daba buenos resultados, (Ver Foto N° 1).

Adicionalmente, éste protocolo tiene como ventaja ser rápido y económico, por lo que fue el método adoptado para el trabajo experimental subsiguiente.

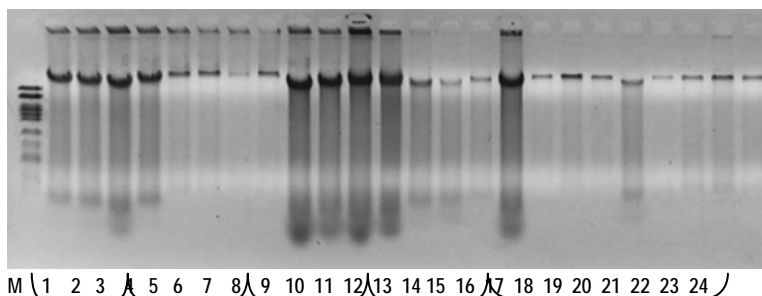


Foto N° 1: Gel de Agarosa 0.7 %. Corrida ADN maíz obtenido a través de los cinco métodos de extracción. M marcador lambda digerido con Pst1. Pozos 1 al 4 (Método Dellaporta); del 5-8 (Método Doyle y Doyle); del 9-12 (Método Murray, M.G y Thompson); del 13 -16 (Método Mini Kit de Qiagen), del 17- 24 (Método kit mini plant Qiagen).

## Cuantificación de ADN

Luego de cuantificar el ADN haciendo uso de lectura espectrofotométrica y a través de la lectura directa del gel con ayuda del programa "Quantity One 4.6.2" de Biorad, se determinó que el método de lectura directa del gel es suficientemente preciso y brinda la posibilidad de trabajar gran número de muestras bajo las condiciones del laboratorio y en situaciones de monitoreo.

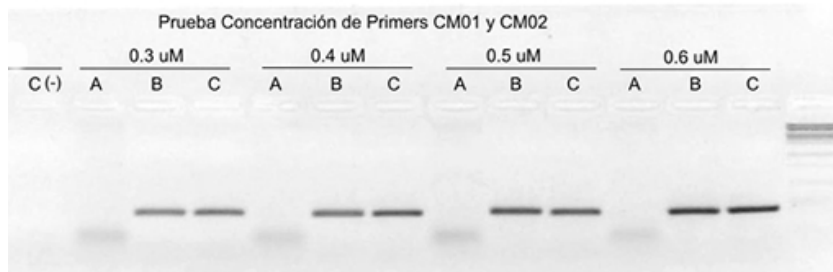
## Determinación cualitativa y preliminar de transgenes: utilización de primers genéricos para P35S y Zeina

Tomando como hipótesis nula:  $H_0$  = grano importado contiene transgenes.

Se procedió a estandarizar los protocolos de detección, según lo ya descrito, utilizando en una primera etapa muestras de grano importado y luego granos de procedencia nacional.

Se condujeron experimentos con diferentes concentraciones de primers (Ver Foto N° 2), evidenciándose una mejor amplificación conforme se incrementa la concentración de los mismos.

En todos los casos el análisis de la muestra de grano importado dio reacción positiva, versus las



muestras de grano nacional que hubieron muestras positivas y negativas.

Foto N° 2: Detección de P35S en muestras de grano importado a diferentes cc. del primer. C(-): control negativo con agua miliQ; M: marcador lambda digerido con PSt1.

En las fotos N° 3 y N° 4 se aprecian respuestas positivas y negativas para detección de P35S en muestras de granos nacionales.

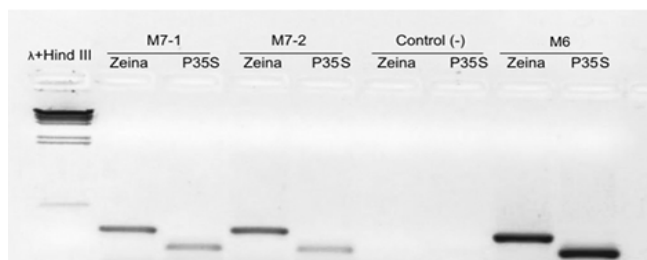


Foto N° 3: Detección de gen de la proteína alfa Zeina y P35S para muestras de granos nacionales. M6 maíz importado

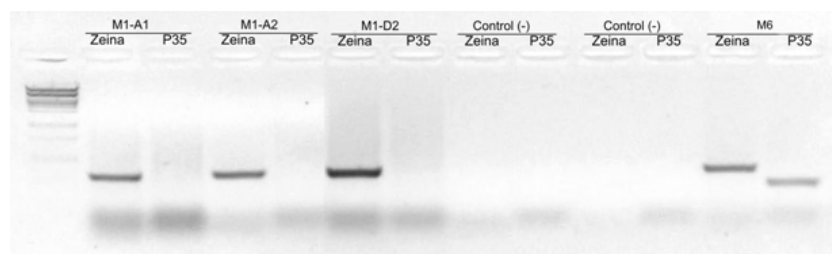


Foto N° 4: ADN de muestras de granos nacionales en las que no se detecta el P35S. M6 maíz importado

### Estandarización de condiciones PCR Multiplex

La estandarización de las variables se realizó en dos pasos: primero utilizando un solo primer y luego incorporando los 15 diferentes primers que permiten identificar a ocho diferentes eventos en maíz, descritos en la metodología.

De los resultados se puede apreciar que las variables que mayormente afectan la calidad de los productos de amplificación son: Concentración de ADN, concentración de  $MgCl_2$  y concentración de dNTP's. Así podemos visualizar en la Foto N° 5 que conforme aumenta la concentración de  $MgCl_2$  se incrementa la intensidad de las bandas.

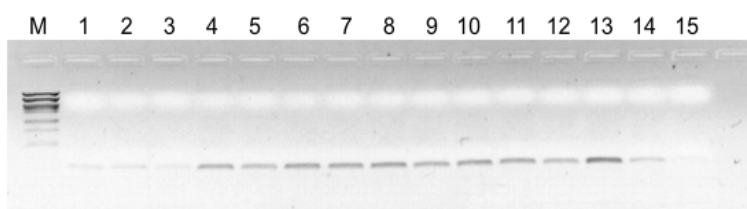
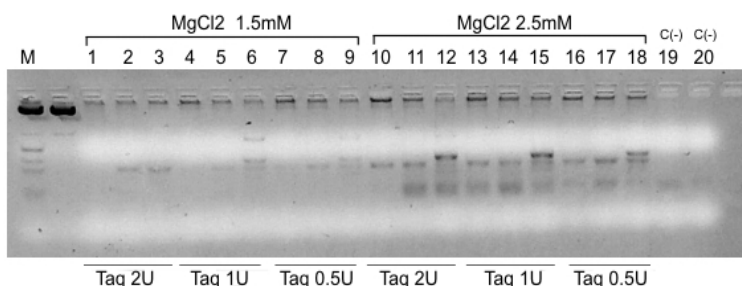


Foto N° 5: Intensidad de bandas generadas por el primer SSIIb a diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ . Posos 1-3 (1.0 mM); del 4-6 (1.5mM); del 7-9 (2.0mM); del 10-12 (2.5mM) y del 13-15 (3.0mM). 3 repeticiones por concentración e  $MgCl_2$ , utilizando 100 ng de 3 muestras distintas. M: marcador lambda digerido con PstI.

Se evaluó el efecto de la concentración de Taq polimerasa (0.5U, 1U, 2U) y  $MgCl_2$  (1.5mM y 2.5mM), en reacciones PCR Multiplex (utilizando 15 diferentes primers), apreciándose una mejor definición de bandas al utilizarse 0.5U de Taq y 2.5mM de  $MgCl_2$  (Ver foto N° 6).

Foto N° 6: Visualización de bandas en muestras de granos de maíz a c.c. diferentes de Taq polimerasa y  $MgCl_2$ . M: marcador preparado de 4 bandas (444pb, 329pb, 220pb y 150pb). Posos 1-3: Taq 2U, 1.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 4-6: Taq 1U, 1.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 7-9: Taq 0.5U, 1.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 10-12: Taq 2U, 2.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 13-15: Taq 1U, 2.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 16-18: Taq 0.5U, 2.5mM  $MgCl_2$ .



Igualmente a concentraciones altas de ADN se notó con claridad la inhibición de la reacción. Asimismo concentraciones bajas de  $MgCl_2$  no favorecen la detección de bandas como puede apreciarse en la Foto N° 7.

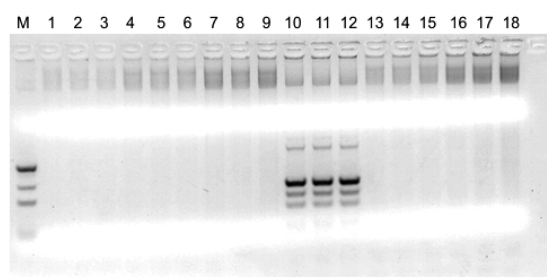


Foto N° 7: Variación en detección de bandas de eventos transgénicos para grano importado con diferentes c.c. de ADN y  $MgCl_2$ . Posos 1-3: 50ng ADN, 1.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 4-6: 75ng ADN, 1.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 7-9: 125ng ADN, 1.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 10-12: 50ng ADN, 2.5mM  $MgCl_2$ ; Posos 13-15: 75ng ADN,

2.5mM MgCl<sub>2</sub>; Posos 16-18: 125ng ADN, .5mM MgCl<sub>2</sub>. M: marcador 3 bandas (329pb, 220pb y 150pb).

Luego de analizar las diferentes variables en estudio, el protocolo para la amplificación PCR Multiplex quedó estandarizado de la siguiente manera:

Para 20ul como volumen total de reacción: 50ng de ADN, 0.3mmol/L dNTP's, 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq polimerasa recombinante, y 15 primers en las siguientes concentraciones: 0.2umol/L para M810 1-5', NK603 1-3', M863 1-5', M863 1-3', Bt11 1-5' y cryIA 1-3'; 0.1umol/L para T25 2-5', T25 2-3', GA21 1-5', GA21 1-3', TC1507 1-5' y TC1507 1-3'; 0.05 umol/L para Event176 1-5'; y 0.045umol/L para SSIIb 1-5' y SSIIb 1-3'.

Amplificación: Termociclador de 96 pozos, Marca BIORAD "i cycler" thermal cycler, modelo: 582BR,

Programa: preincubación 95°C por 10 min; 10 ciclos de denaturación a 95°C por 0.5 min, annealing a 65°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min; 27 ciclos de denaturación a 95°C por 0.5 min, annealing a 60°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min; seguido de una elongación final a 72°C por 7 min.

#### Identificación de eventos transgénicos en granos importados

Se procedió a amplificar el ADN de la muestra utilizando por separado cada par de primer de cada uno de los eventos, según Cuadro N° 3, se hicieron 3 repeticiones independientes y momentos diferentes.

En la Foto N° 8 se puede apreciar que la muestra evidencia bandas para los eventos NK603 y MON810.

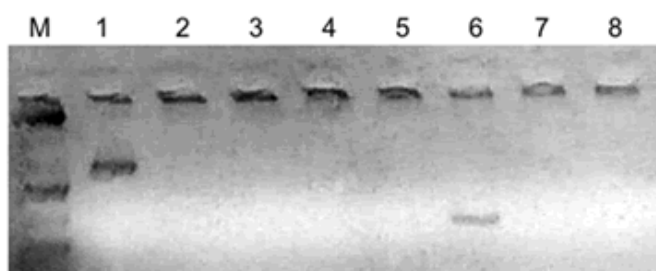


Foto N° 8: Resultado de productos de amplificación de ADN grano maíz importado. Visualización de bandas de eventos. M: Marcador de tres bandas (329pb, 220pb y 150pb); Poso 1: NK603, Poso 2: E176, Poso 3: T25, Poso 4: GA 21, Poso 5: MON 863, Poso 6: MON810, Poso 7: TC1507 y Poso 8: Bt11

#### Identificación de eventos transgénicos en granos de procedencia nacional

Se analizaron las muestras que figuran en el Cuadro N° 2. De las 25 muestras analizadas, 14 dieron respuesta positiva para al menos un evento. En el cuadro N° 4, se muestran los resultados obtenidos.

CUADRO N° 4. RESULTADO DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE BARRANCA

| Muestra | Código | Resultado |
|---------|--------|-----------|
| M 8     | 128530 | Negativo  |
| M 11    | 128583 | Negativo  |
| M 13    | 128582 | Positivo  |
| M 14    | 128578 | Positivo  |
| M 17    | 128570 | Positivo  |
| M 19    | 128566 | Negativo  |
| M 20    | 128569 | Negativo  |
| M 21    | 128575 | Positivo  |
| M 22    | 128565 | Negativo  |
| M 24    | 128561 | Negativo  |
| M 28    | 128590 | Positivo  |
| M 29    | 128589 | Positivo  |
|         |        |           |

| Muestra | Código  | Resultado |
|---------|---------|-----------|
| M 30    | 128629  | Negativo  |
| M 31    | 128603  | Positivo  |
| M 36    | 128636  | Negativo  |
| M 39    | 128650  | Negativo  |
| M 41    | 128635  | Positivo  |
| M 42    | 128693  | Negativo  |
| M 43    | 128692  | Negativo  |
| M 44    | 128691  | Positivo  |
| M 45    | 128690  | Positivo  |
| M 48    | 128685  | Positivo  |
| M 50    | 1128665 | Positivo  |
| M 52    | 128762  | Positivo  |
| M 53    | 128761  | Positivo  |

En las fotografías 9 y 10 se aprecia la detección de bandas para al menos un evento transgénico por muestra.

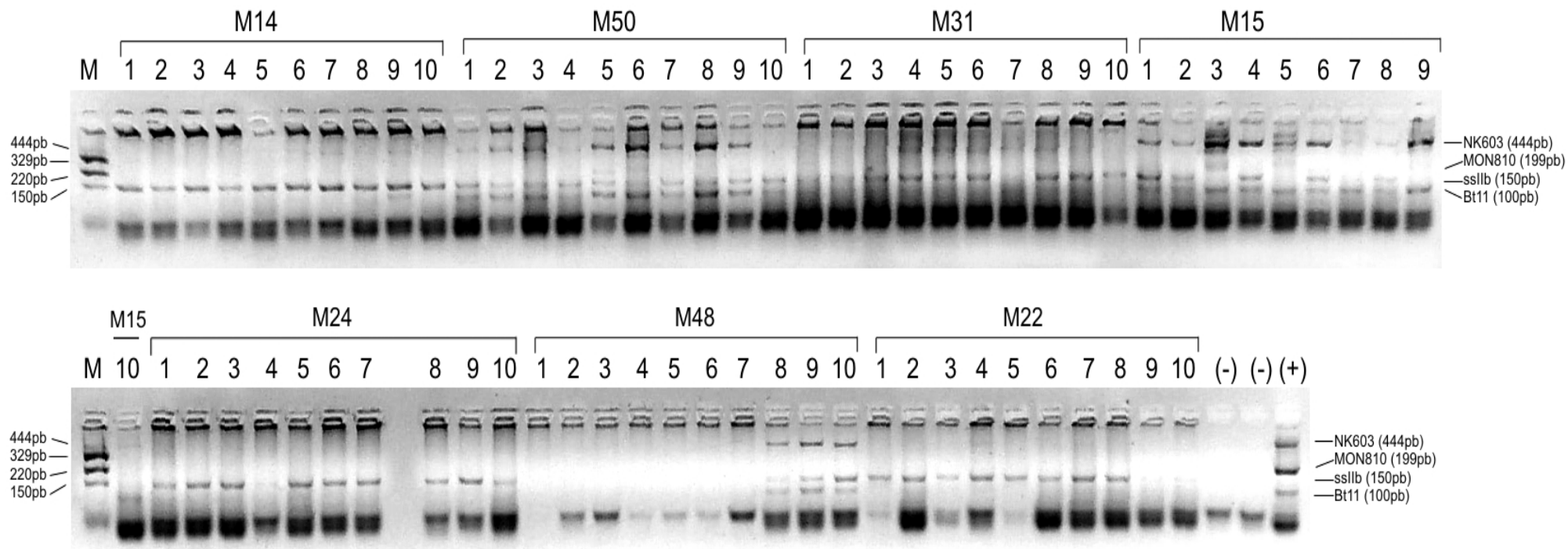


Foto N° 9: Visualización de bandas de eventos transgénicos en ADN de muestras de maíz de procedencia nacional

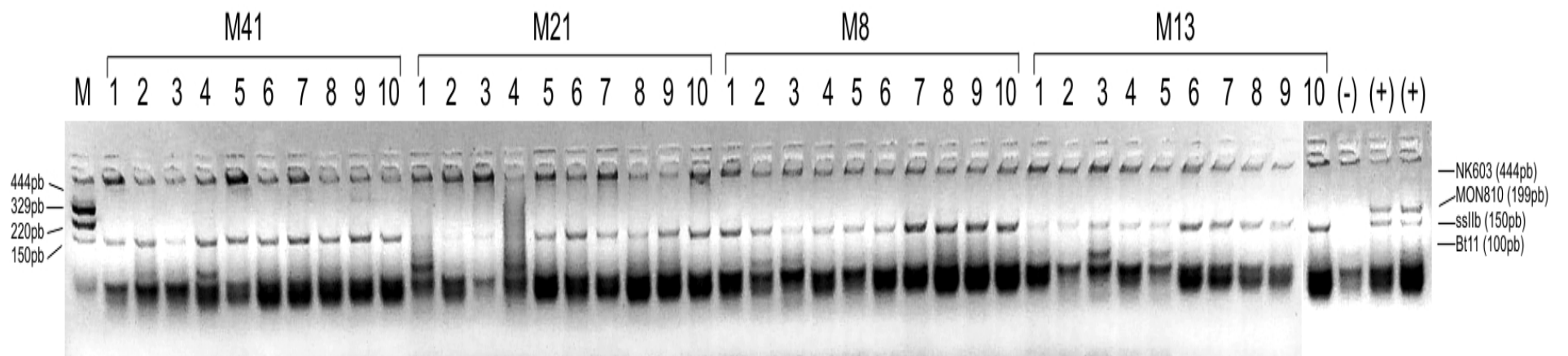


Foto N° 10: Visualización de bandas de eventos transgénicos en ADN de muestras de maíz de procedencia nacional

## CONCLUSIONES

1.- La metodología de PCR Multiplex es suficientemente sensible, limpia y reproducible bajo los parámetros:

Para 20ul de reacción: 50ng de ADN, 0.3mmol/L dNTP's, 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1UTaq polimerasa recombinante, y primers (0.2umol/L para M810 1-5', NK603 1-3', M863 1-5', M863 1-3', Bt11 1-5' y cryIA 1-3'; 0.1umol/L para T25 2-5', T25 2-3', GA21 1-5', GA21 1-3', TC1507 1-5' y TC1507 1-3'; 0.05 umol/L para Event176 1-5'; y 0.045umol/L para SSIIb 1-5' y SSIIb 1-3')

Programa Amplificación: preincubación 95°C por 10 min; 10 ciclos de denaturación a 95°C por 0.5 min, annealing a 65°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min; 27 ciclos de denaturación a 95°C por 0.5 min, annealing a 60°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min; seguido de una elongación final a 72°C por 7 min.

2.- Los granos de maíz importados para uso industrial contienen granos transgénicos, habiéndose detectado la presencia de eventos MON810, NK603.

3.- En los granos cosechados en el Valle de Barranca se detectó la presencia de los eventos NK603 y Bt11.

## RECOMENDACIONES

Continuar con el monitoreo de la dispersión de eventos transgénicos en el territorio peruano y desarrollar herramientas técnicas para un adecuado manejo de los OVM's.

## AGRADECIMIENTOS/FINANCIACIÓN

Se agradece a la Asociación Desarrollo Medio Ambiental Sustentable por haber financiado el costo del presente estudio.

## REFERENCIAS

- Bonfini, L.; Heinze, P.; Kay, S.; Van den Eede G. 2001. Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission, Joint Research Centre.
- Collonnier, C.; Schattner, A.; Berthier, G.; et al. 2005. Characterization and Event Specific-Detection by Quantitative Real-Time PCR of T25 Maize Insert. Journal of AOAC International, 88(2): 536-546.
- Dellaporta, S.L.; Word, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21



- Doyle & Doyle 1990. Isolation of DNA for small amounts of plant tissues. *BRL Focus*12:13-15
- Germini, A.; Zanetti, A.; Salati, C.; Rossi, et al. 2004. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3275-3280.
- Gutiérrez- Rosati, A. 2006. Maíz, Riqueza Genética. Asociación Desarrollo Medio Ambiental Sustentable. 56 pp.
- Hernández, M.; Esteve, T.; Prat, S.; et al. 2004. Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I, Amplifluor™ and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. *Journal of Cereal Science*, 39(1): 99-107
- Holck, A.; Vařtilingom, M.; Didierjean, L.; et al. 2002. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *European Food Research and Technology*, 214: 449-453
- James, C. Review-Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007. *ISAAA Briefs* 37. 2007.
- James, D.; Schmidt, A.-M.; Wall, E.; et al. 2003. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5829-5834.
- La Paz, J.L.; Esteve, T. y Pla, M. 2007. Comparison of Real-Time PCR Detection Chemistries and Cycling Modes Using Mon810 Event-Specific Assays as Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (11): 4312 -4318.
- Matsuoka, T.; Kawashima, Y.; Akiyama, H.; et al. 2000. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *Journal of the Food. Hygienic Society of Japan*, 41: 137-143.
- Matsuoka, T.; Kuribara, H.; Akiyama, H.; et al. 2001. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *Journal of the Food. Hygienic Society of Japan*, 42: 24-32.
- Ministerio de Agricultura del Perú. Cadena Maíz amarillo duro, avicultura y porcicultura. Segundo bulletin. 2005.
- MON863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence. [Journal of Cereal Science](#), 43(2): 250-257
- Murray, M.G y Thompson, W.F.1980. Rapid isolation of high molecular weight Plant DNA. *Nucleic Acid Research* 8, 4321-4325.

- Nielsen, C.; Berdal, K. y Holst-Jensen, A. 2004. Characterisation of the 5' integration site and development of an event-specific real-time PCR assay for NK603 maize from a low starting copy number. *European Food Research and Technology*, 219(4): 421-427.
- Onishi, M.; Matsuoka, T.; Kodama, T.; et al. 2005. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for Simultaneous Detection of Eight Events of Genetically Modified Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9713-9721.
- Pan, A.; Yang, L.; Xu, S.; et al. 2006. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence. *Journal of cereal science*, 43(2): 250-257.
- Pietsch, K.; Waiblinger, H.; Brodmann, P.; et al. Screeningverfahren zur Identifizierung "genetisch veränderter" pflanzlicher Lebensmittel. 1997. En: Bonfini, L. Heinze, P., Kay, S., Van den Eede, G. 2001. Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission, Joint Research Centre, Pg 9.
- Pla, M.; Hernández, M.; Prat, S.; et al. 2003. A Specific Real-Time Quantitative PCR Detection System for Event MON810 in Maize YieldGard® Based on the 3'-Transgene Integration Sequence. *Transgenic Research*, 12(2): 179-189.
- Quist, D. and Chapela, I. 2001 Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico *nature*, vol 414 pg541-543.
- Ronning, S.; Vaitilingom, M.; Berdal, K.; Holst-Jensen, A. 2003. Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *European Food Research and Technology*, 216(4): 347-354.
- Sevilla, R. 2005. Magnitud e impacto de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales - Caso Maíz. CONAM.
- Weighardt, F.; Barbati, C.; Paoletti, C.; et al. 2004. Real-Time Polymerase Chain Reaction-Based Approach for Quantification of the pat Gene in the T25 *Zea mays* Event. *Journal of AOAC International*, 87(6): 1342-1355.
- Yang, L.; Xu, S.; Pan, A.; et al. 2005. Event Specific Qualitative and Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Genetically Modified MON863 Maize Based on the 5'-Transgene Integration Sequence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (24): 9312 -9318.
- Zimmermann, A.; Lüthy, J. y Pauli, U. 2000. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33(3): 210-216.