



INFORME TÉCNICO

“Verificación de la presencia de cultivos de maíz transgénico en el valle de Barranca”.

RESUMEN

Dos estudios realizados en el país informaron sobre la posible presencia de cultivos no autorizados de maíz transgénico en el valle de Barranca. El primer estudio reporta la presencia de los eventos BT11 y NK603 con una frecuencia del 33%. El segundo estudio corrobora la presencia del evento NK603 y la presencia de 2 nuevos eventos (T25 y MON863) con una frecuencia del 62% en las muestras de grano colectadas en la referida localidad. Ante tales denuncias, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) solicitó mayor información sobre los hallazgos reportados, así como las respectivas contramuestras a la autora del trabajo para validar dichas denuncias. Sin embargo, no se reportó mayor información ni se remitieron las contramuestras respectivas. El INIA desarrolló el presente trabajo de investigación para verificar la presencia de cultivos ilegales de maíz transgénico que fueran reportados en la localidad de Barranca. Para ello, se colectó un total de 162 muestras de maíz (134 provenientes de campos de cultivo, 15 de mercados locales, 8 de los centros de acopio de empresas avícolas, 1 muestra del centro de acopio local y 4 muestras de las empresas comercializadoras de semillas) las cuales fueron remitidas al Laboratorio de Detección de OVM del INIA, para la detección cualitativa por PCR de las secuencias P35S y Tnos, así como de los eventos específicos BT11, NK603, T25, 176, TC1507 y MON810. Las 134 muestras de maíz provenientes de los campos de cultivo fueron evaluadas *in situ* mediante tiras reactivas, para detectar la presencia de los eventos BT11 y NK603, sin tener ningún resultado positivo. En el análisis por PCR no se detectó ninguno de los 6 eventos específicos evaluados en las muestras provenientes de campos de cultivo, mercados locales, empresas comercializadoras de semillas y del centro de acopio local. Como era de esperarse, se detectaron 4 eventos en las muestras de grano procedentes de los centros de acopio de las empresas avícolas, dado que son las principales importadoras de granos de maíz a granel proveniente de países productores de OVM como Argentina y Estados Unidos. En conclusión, no se ha detectado ninguno de los eventos de maíz transgénico reportados como cultivados en el valle de Barranca.



1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO:

Con el inminente desarrollo de la biotecnología moderna y su aplicación en la generación de nuevas variedades de cultivos, especialmente en las especies vegetales de importancia alimenticia a nivel mundial, se ha establecido la era de la producción de alimentos por medios biotecnológicos.

Actualmente, la adopción de los cultivos genéticamente modificados o “transgénicos” se ha incrementado hasta 80 veces más que en el año 1996. Para el año 2009, se ha calculado un total de 134 millones de hectáreas cultivadas con organismos genéticamente modificados, con una tasa de crecimiento interanual del 7%, equivalentes a 9 millones de hectáreas (James, 2009). Este incremento se ha realizado especialmente en Suramérica donde algunos países como Ecuador, Venezuela, Perú y las 3 Guayanas, no han oficialmente autorizado la siembra de éstos cultivos en su territorio.

Los estudios sobre los impactos en el ambiente y en particular sobre la biodiversidad por la adopción de los cultivos GM son limitados en nuestro continente, donde la conservación de la megadiversidad es estratégica y prioritaria en la mayoría de países de la región, como el Perú. Por ello, se ha implementado una serie de normatividades a nivel nacional e internacional para evitar o minimizar los posibles riesgos derivados por la utilización de los Organismos Vivos Modificados (OVM).

En el Perú, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) desde el año 2002 ha sido designado, mediante la Ley 27104 y su Reglamento (D.S. N° 108-2002), como el Órgano Sectorial Competente para el sector agricultura encargado de hacer cumplir lo estipulado en el marco normativo nacional e internacional para regular, administrar y controlar los riesgos derivados del uso confinado y liberación al ambiente de los OVM o “transgénicos”. Razón por la cual, toda persona que pretenda realizar actividades de: Investigación, Producción, Introducción, Manipulación, Transporte, Almacenamiento, Conservación, Intercambio, Comercialización, Uso Confinado y Liberación, con OVM bajo condiciones controladas, deberá solicitar su Inscripción y el Registro del OVM (organismo transgénico) ante el Instituto Nacional de Innovación Agraria.

El INIA con fecha 15 de noviembre del 2007 recibió de parte de la Dra. Antonieta Gutiérrez, docente de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), un resumen de los resultados obtenidos de una investigación que desarrolló sobre la detección de maíz modificado genéticamente en muestras de granos procedentes del valle de Barranca, en el cual se concluye la presencia de dos eventos transgénicos en muestras de maíz procedentes de los campos de cultivo de dicha localidad.

Ante tal denuncia, el INIA solicitó formalmente mayor información a la Dra. Gutiérrez sobre la ubicación de los campos de cultivo donde se obtuvieron las muestras, así como la remisión de las contramuestras respectivas para validar su denuncia. Lamentablemente, no se brindaron mayores detalles ni se obtuvieron las respectivas contramuestras.

El INIA a través del Componente Regulación de la Seguridad de la Biotecnología Moderna desarrolló el presente trabajo de investigación: "Verificación de la presencia de cultivos de maíz transgénico en el valle de Barranca", con el fin de determinar la existencia de



cultivos ilegales en dicha zona, como parte de las labores de Supervisión y Monitoreo de los campos de cultivo que el Componente Regulación de la Seguridad de la Biotecnología Moderna del INIA tiene previsto desarrollar anualmente.

Para ello, se han sostenido 3 Reuniones de Trabajo desde agosto a octubre del año 2009, llevadas a cabo en las instalaciones de la Agencia Agraria de Barranca, con la participación de los representantes de la Agencia Agraria de Barranca, La Junta de Usuarios del Valle Pativilca, La Oficina de Promoción Agraria-MINAG, La Oficina de Información Agraria-MINAG y Agricultores de Barranca, quienes mostraron interés en el tema.

Se realizaron 2 misiones de colecta de Material Biológico de maíz, en las cuales se recolectaron un total de 162 muestras (134 provenientes de campos de cultivo, 9 de centros de acopio, 15 de mercados locales y 4 muestras de semillas) (Tabla 3), para lo cual se contó con el apoyo de la Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente (Gobierno Regional de Lima), La Agencia Agraria de Barranca, la Junta de Usuarios del Valle de Pativilca y la Junta de Usuarios del Valle Fortaleza. Dichas muestras fueron remitidas al Laboratorio de Detección de OVM del INIA para los análisis correspondientes.

2. OBJETIVOS:

a) Evaluar cualitativamente la presencia de cultivos de maíz genéticamente modificado en la provincia de Barranca.

a.1) Identificar la presencia del promotor P35S y la secuencia Tnos en muestras de granos y hojas de maíz provenientes de campos de cultivo, mercados locales, comercializadoras de semillas y centros de acopio de la provincia de Barranca.

a.2) Identificar la presencia de la proteína CP4 EPSPS provenientes del evento NK603 y de la proteína BT (Cry1Ab) provenientes del evento BT11 en muestras de granos y hojas de maíz provenientes de campos de cultivo, mediante inmunoensayos.

a.3) Identificar la presencia de los eventos BT11, NK603, T25, 176, TC1507 y MON810 en muestras de hojas y granos de maíz, provenientes de campos de cultivo, mercados locales, centros de acopio y comercializadoras de semillas de la provincia de Barranca, mediante la amplificación PCR con iniciadores específicos.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Posible presencia de cultivos de maíz GM en el Perú.

El primer trabajo sobre la posible presencia de cultivos transgénicos en el país fue realizado por la Dra. Antonietta Gutiérrez, cuyos resultados fueron publicados en un diario de circulación nacional el mes de noviembre del año 2007 (Ortiz, 2007). Los resultados obtenidos por la Dra. Gutiérrez indicaron que de las 42 muestras de grano de maíz amarillo duro obtenidas del valle de Barranca, 14 de ellas (33.3%) fueron positivas para 2 tipos de eventos: BT11 y NK603 (Resistencia contra insectos y Tolerancia al herbicida glifosato, respectivamente) (Ortiz, 2007). Este mismo trabajo de investigación fue posteriormente



presentado al 13° Congreso Latinoamericano de Genética, celebrado el año 2008 en la ciudad de Lima, Perú y publicado en la respectiva revista. (Gutiérrez-Rosati et al., 2008).

Los resultados de un segundo estudio realizado por la Dra. Gutiérrez, fueron publicados el mes de julio del año 2009 en un diario nacional. La autora indica que se analizaron 319 muestras de grano de maíz amarillo duro colectadas en 5 regiones del país (Piura, Lambayeque, La Libertad, Ancash y Lima), en las cuales se detectan los eventos MON863, NK603 y T25 (62% en Barranca y 60% en Jequetepeque) (Luna, 2009).

Existe un informe técnico publicado por el Punto Focal Nacional en Bioseguridad en la página web del BCH (Biosafety Clearing House), donde se hace mención de la existencia de **“reportes de mezcla de material transgénico con variedades locales”** de maíz (Pastor, 2009) a los cuales no se ha podido acceder, ni se tiene conocimiento previo de la existencia de los mismos.

3. 2. La demanda de maíz amarillo duro en el Perú

En el Perú, de acuerdo a los datos publicados por la Oficina de Información Agraria del Ministerio de Agricultura, la producción nacional de maíz amarillo duro para la campaña 2008-2009 fue de 1,273,298 Tm, evidenciando un incremento en la producción nacional del 20.47% con relación a la campaña 2000-2001 (Figura 1). La región Lima es la zona de mayor producción a nivel nacional con un promedio anual de 214,642 Tm.

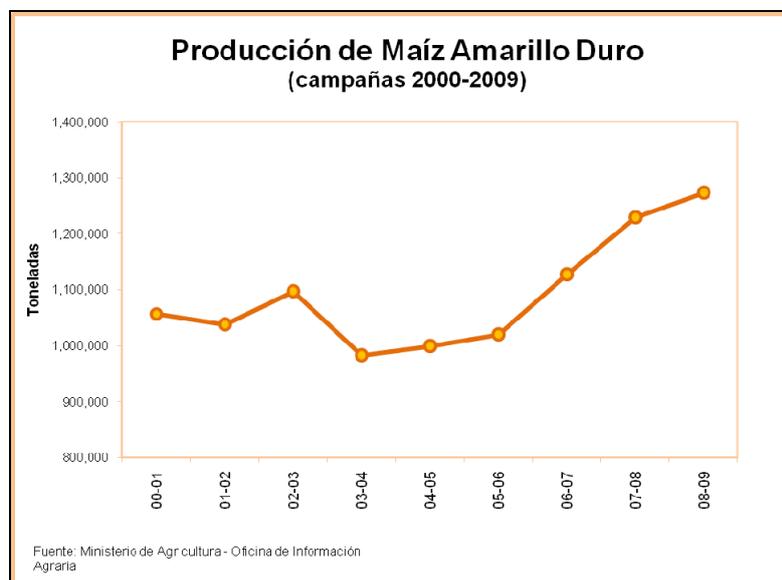


Figura 1. Producción nacional de maíz amarillo duro. Campañas agrícolas del 2000 hasta el 2009.

Este incremento en la producción de maíz amarillo duro no está correlacionado con el incremento en el superficie cultivada que se destina para su producción, que sólo alcanzó un incremento del 2.46% en los últimos nueve años.



Asimismo, se ha experimentado una mayor demanda en la importación de semillas de maíz, la cual para la campaña 2000-2001 fue de apenas 680.17 Tm, pasando a 2,303.96 Tm para la campaña 2008-2009, lo cual significó un incremento del 238.73% (Figura 2).



Figura 2. Importación de semillas de maíz amarillo duro. Del año 2000 hasta el 2009.

La importación de granos de maíz amarillo duro tuvo un incremento del 64.48% en los últimos nueve años (Figura 3); siendo Argentina el principal país abastecedor de este producto, con el 75% de las importaciones, seguido de Estados Unidos con un 21%. Ambos países son actualmente los principales productores de cultivos genéticamente modificados en el continente Americano.

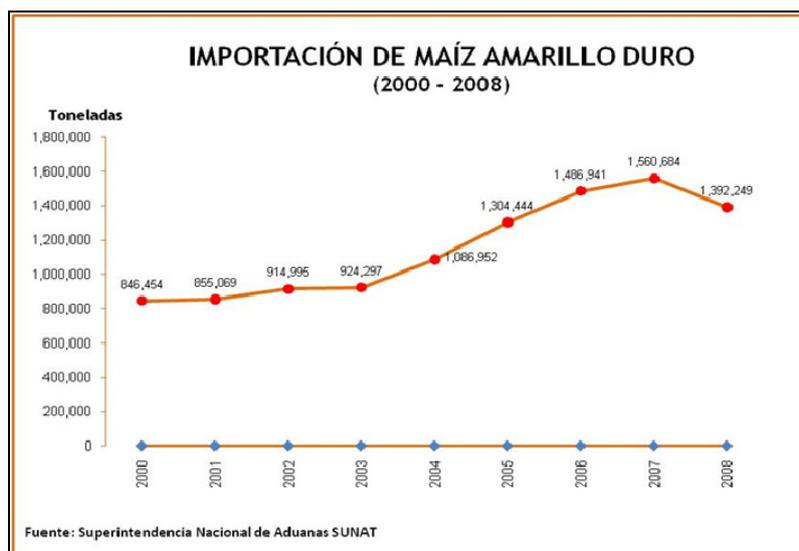


Figura 3. Importación de granos de maíz amarillo duro. Del año 2000 hasta el 2009.



A pesar que la producción nacional de maíz amarillo duro se incrementó en un 20.47% del 2000 al 2009, también se elevaron los niveles de importación de este producto hasta en un 64.48% durante el mismo periodo de tiempo.

Actualmente, el 52.23% de granos de maíz que se consumen a nivel nacional son importados, debido al incremento hasta en un 40% en la demanda nacional de este producto en los últimos 9 años.

3. 3. La variabilidad genética de maíz en el Perú.

Hasta la fecha no se tienen reportes sobre la existencia de subespecies, ni de especies silvestres emparentadas con el maíz en el territorio nacional; excepto la especie *Tripsacum australe*, (Grobman, 1967) la cual constituye el pool genético terciario, cuya probabilidad de cruzamiento con el maíz cultivado (*Zea mays* subesp. *mays*) de modo natural es casi imposible (Mangelsdorf, 1974; Sevilla, 2005).

La variabilidad genética de maíz en el Perú está conformada por las distintas razas locales que se cultivan en varias regiones del país, especialmente en la sierra, donde existe la mayor variabilidad genética de este cultivo (Sevilla, 2005). Existen diferentes reportes con relación al número de razas que alberga el país, desde los 49 grupos raciales reportados inicialmente (Grobman et al., 1961) hasta llegar a las 55 razas que conserva el programa de Maíz de la Universidad Nacional Agraria La Molina, de las cuales ocho razas son apenas distinguibles o definidas con dificultad; por ser posiblemente variantes de las existentes o malformaciones de la mazorca (Sevilla, 2005).

Uno de los primeros estudios sobre la variabilidad genética del maíz en el Perú fue realizada el año 1961 por Alexander Grobman, Wilfredo Salhuana y Ricardo Sevilla en colaboración con Paul Mangelsdorf, publicado en el libro: “Races of Maize in Perú their origins, evolution and classification”, el cual describe un total de 49 razas de maíz existentes en aquella época (Grobman et al., 1961). Posteriormente, empleando técnicas de taxonomía numérica se clasifican 2 razas adicionales a las descritas.

El Consejo Nacional del Ambiente (CONAM) publicó el año 2005 el documento: “Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales”, el cual en el capítulo correspondiente al cultivo de maíz menciona la existencia de 51 razas en el territorio nacional, las mismas que se conservan debido a factores biológicos, ecológicos y antropológicos; siendo la región natural de la Sierra la que alberga la mayor cantidad de razas (Hidalgo et al., 2005).

El Programa Cooperativo de Investigaciones en Maíz (PCIM) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) define 55 grupos raciales de maíz (Tabla 1) existentes en el territorio nacional, los cuales son conservados en el Banco de Germoplasma de esta institución, con sus respectivas réplicas en centros internacionales.

Debido a la alta concentración de razas de maíz en la sierra, existe una considerable mezcla entre ellas, debido a la ancestral costumbre de cultivar distintas razas o variedades en un mismo campo. Sin embargo, estas mezclas varietales son fácilmente identificables por los propios agricultores, más aún si la mezcla es ocasionada por el polen de variedades



introducidas al país desde la década de los 60's, como los híbridos provenientes del CIMMYT, Argentina, Brasil y el Cubano "Cuban Yellow" (Sevilla, 2005).

Tabla 1. Razas de maíz existentes en el Perú.

Razas	Costa	Sierra	Selva
Razas Primitivas		Confite Morocho Confite Puntiagudo Confite Puneño Kully	Enano
Razas Derivadas de las Primeras	Mochero Alazan Pagaladroga Rabo de Zorro Chapareño Iqueño	Chullpi Huayleño Paro Morocho Huancavelicano Ancashino Shajatu Piscorunto CUSCO Cristalino Amarillo CUSCO Blanco Granda Uchuquilla	Sabanero Piricinco
Razas de Segunda Derivación	Huachano Chancayano	San Gerónimo San Gerónimo Huancavelicano CUSCO Gigante Arequipeño	Chimlos Marañon
Razas Introducidas	Pardo Arizona Colorado		Alemán Chuncho Cuban Yellow
Razas Incipientes	Jora Coruca Chancayano Amarillo Tumbesino Morochillo	Morado Canteño Morocho Cajabambino Amarillo Huancabamba Allajara Huarmaca Blanco Ayabaca Huanuqueño	
Razas No Definidas		Sarco	Perlilla

Fuente: Programa de Maíz de la UNALM.

Para tener una aproximación de la distribución geográfica de las variedades y razas criollas de maíz que fueron reportadas en el Perú, se accedió a los mapas de la distribución de la variabilidad genética de maíz generados por el INIA, a partir de la información contenida en el Catálogo de Recursos Genéticos de Maíz de Sudamérica, publicado el año 1986 por la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). En dicho documento se encuentran registradas las principales variedades o razas locales de maíz que fueron obtenidas en misiones de colecta realizadas en territorio nacional desde el año 1952 hasta el año 1980 por el Programa Cooperativo de Investigaciones en Maíz de la UNALM.

Los mapas de la distribución de la variabilidad genética del maíz fueron revisados por expertos nacionales en el cultivo, como el Ing. Ricardo Sevilla, para conocer las zonas donde se reportó la mayor ocurrencia de variedades y razas locales de maíz en el Perú, la misma que se encuentra principalmente en la zona de la sierra (Figura 4).

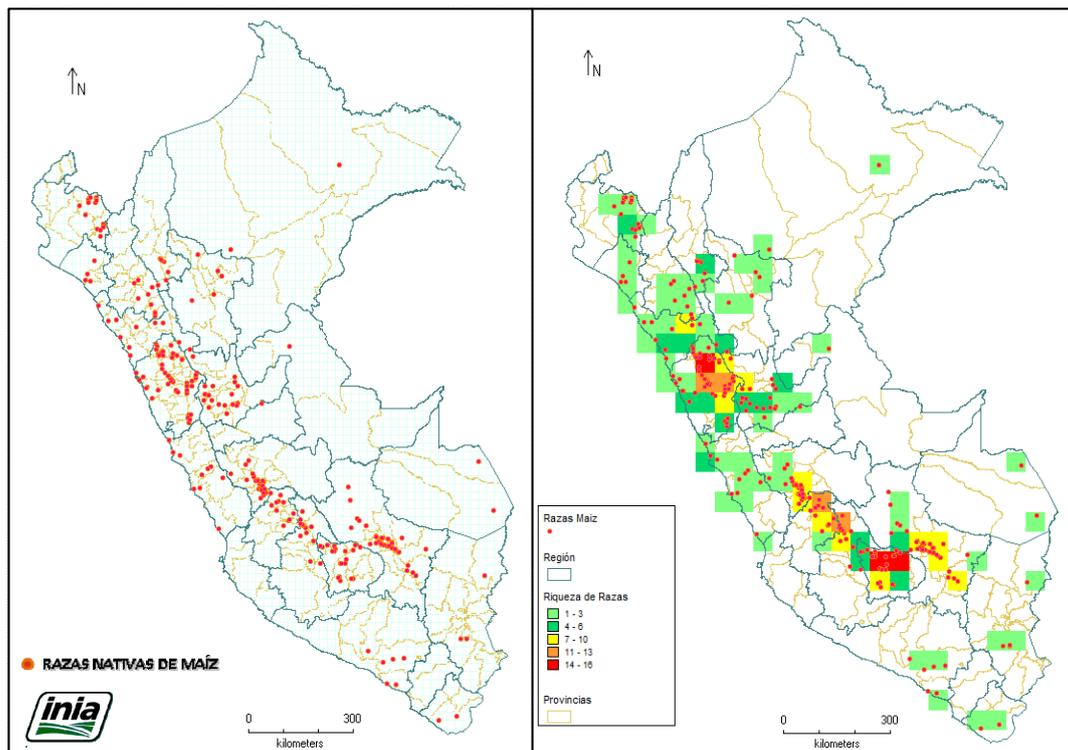


Figura 4. Distribución geográfica de las variedades locales de maíz reportadas en el territorio nacional.

3. 4. La variabilidad genética de maíz en México

A pesar de que aún no existe un consenso mundial acerca de cómo y dónde ocurrió el origen y la evolución temprana del maíz (Kato et al., 2009), se conoce que uno de los principales centros de origen y de diversidad del maíz se encuentra en México (OECD, 2003), donde existen 3 especies dentro del género *Zea* (*Zea mays*, *Zea perennis* y *Zea diploperennis*), 3 subespecies de *Zea mays* (*mays*, *mexicana* y *parviglumis*) los 2 últimos conocidos comúnmente como “teocintles” y 61 razas locales (Tabla 2).



Tabla 2. Diversidad genética del maíz existente en México.

Genero	Especie	Sub especie	Razas
Zea	mays	mays	61
		mexicana	--
		parviglumis	--
	perennis	--	--
	diploperennis	--	--

Fuente: CONABIO

3. 5. Posible presencia de transgenes en cultivares nativos de maíz en México.

En el año 2001 se publicó en la reconocida revista “Nature” el primer hallazgo de transgenes en el maíz nativo de Oaxaca en México (Quist y Chapela, 2001). Dicho estudio enfatiza la posible introgresión del ADN transgénico en las razas nativas tradicionales de la región de Oaxaca.

Este reporte fue rechazado a nivel científico debido principalmente a 3 temas importantes: La falta de calidad técnica del reporte, la invalidez de los resultados presentados (Kaplinsky et al., 2002; Christou, 2002; Metz y Fütterer, 2002) y finalmente, las posibles consecuencias e implicaciones de la introgresión de los transgenes en los cultivares locales (Eastham y Sweet, 2002; Cleveland et al., 2005).

El gobierno mexicano a través del Instituto Nacional de Ecología, efectuó un estudio para confirmar la presencia de transgenes en los cultivares nativos de maíz en Oaxaca. Dicho estudio confirmó el flujo de polen desde las variedades de maíz de origen transgénico hacia las razas locales de maíz en al menos 2 estados mexicanos (Álvarez, 2002).

Sin embargo, el año 2005 el Instituto Nacional de Ecología de México, publica su estudio realizado para detectar la presencia de transgenes en las razas nativas de maíz en México, el cual concluye que no fue posible detectar dichos transgenes a pesar de la gran cantidad de muestras analizadas (870 plantas, 125 campos de cultivo y 18 localidades del estado de Oaxaca) (Ortiz-García et al., 2005).

En el año 2008, la Universidad Nacional Autónoma de México, publica los resultados de su estudio donde concluye haber detectado la presencia de transgenes en los cultivares de maíz en México, los mismos que no fueron detectados por los trabajos realizados por el Instituto Nacional de Ecología de México (Piñeyro-Nelson et al., 2008). Sin embargo, el mencionado trabajo también tuvo varias críticas debido a inconsistencias en la metodología (Schoel y Fagan, 2009).



Es evidente que el principal tema de discusión y controversia es la presencia de transgenes en cultivares locales, lo que constituye para algunos la denominada “contaminación genética”, la misma que es denunciada por el Punto Focal Nacional de Bioseguridad del Perú, mencionando que los reportes de estos estudios están disponibles en la página web del BCH nacional, a los cuales no hemos tenido acceso, ni se conoce de la existencia de los mismos. Cabe mencionar que hasta la fecha no existe ningún reporte o evidencia científica, publicada en la página web del BCH, que sustente un impacto negativo relacionado con la pérdida o erosión genética que haya sido originada por la liberación de los OVM al ambiente.

4. ÁREA DE TRABAJO:

El presente proyecto abarcó principalmente la cuenca del río Pativilca, por ser la principal cuenca en la provincia de Barranca, 4 distritos (Barranca, Supe, Pativilca y Puerto Supe) y 16 Comisiones de Regantes pertenecientes a la Junta de Usuarios del Valle de Pativilca, la cual abarca incluso al distrito de Cochas, provincia de Ocros, región Ancash. Adicionalmente, se realizó un muestreo en la Junta de Usuarios del Valle Fortaleza (Figura 4.a). Las localidades evaluadas se detallan en la Tabla 3.

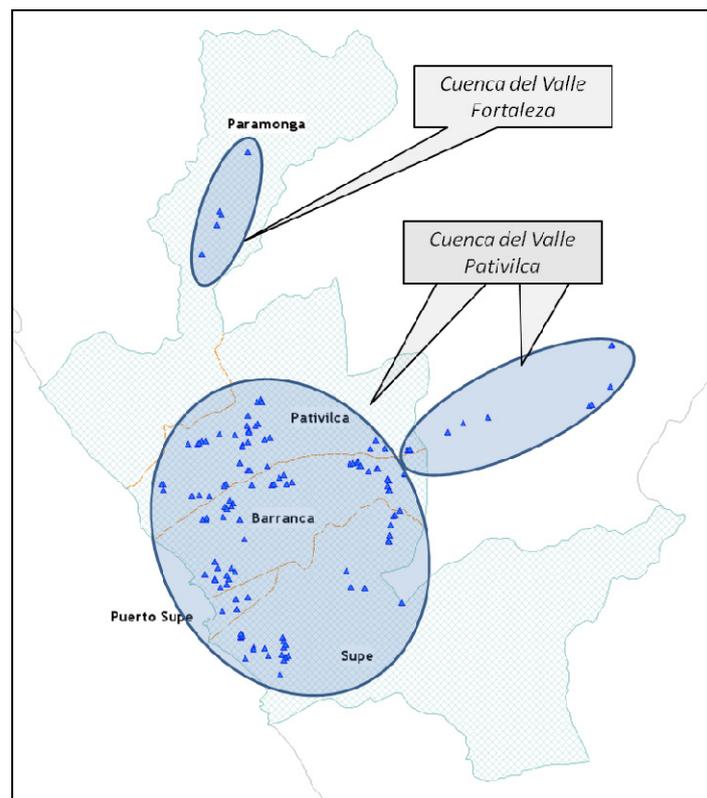


Figura 4.a Área de Trabajo: Lugares donde se realizaron las labores de colecta en la provincia de Barranca (Junta de Usuarios del Valle de Pativilca y Fortaleza).



4. 1. Personal Involucrado:

INSTITUCIÓN	REPRESENTANTE
Agencia Agraria de Barranca.	Miguel Melgarejo Escudero
	Luis Palomino Zurita
	Pedro Marcelo Melgarejo
Junta de Usuarios del Valle Pativilca (JUVP)	Alejandro Flores Sánchez
	Javier Bejarano Chacón
	Wilson Castañeda
Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente (Gobierno Regional de Lima).	Luis Castillo Polo
	Antonio Tejada
	Milagros Coral
Instituto Nacional de Innovación Agraria	Jorge Alcántara Delgado
	Luis Fernando Rimachi Gamarra
	Lina Bernaola Alvarado
	Yeny Aquino Villasante
	Miguel Peña Ramos



5. MATERIALES y MÉTODOLOGÍA

5.1. Tamaño de Muestra.

Se consideró al campo de cultivo como unidad experimental, estimando el tamaño de muestra para una variable categórica (presencia o ausencia) con un tamaño de población finito (Cochran, 1977) según los parámetros especificados a continuación.

$$n = \frac{N * Z_{1-\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{1-\alpha}^2 * p * q} \quad (\text{Cochran, 1977})$$

Donde:

n	Tamaño Muestra	??
N	Tamaño Población	2100
p	Prevalencia	0.1
q	1-p	0.9
d	Precisión	0.05
α	Nivel de significancia	5%
1-α	Nivel de confianza	95%
Z _(1-α)	Valor tipificado	1.96

Considerando los reportes previamente publicados, que indican frecuencias del 33.3% y 62% de cultivos de maíz transgénico en el valle de Barranca (Gutierrez et al., 2008; Gutierrez, 2009) y basados en la aproximación anteriormente descrita, se determinó un tamaño de muestra de 130 campos de cultivo.

Una segunda aproximación evalúa la posible presencia adventicia de los OVM, debido al uso de los granos importados de maíz como semilla, a través de su probabilidad de detección: $Pd=1-(1-p)^{m*s}$ (Lockwood et al., 2007; citado por Piñeyro-Nelson, et al., 2008; Remund et al., 2001).

Donde:

Pd = Probabilidad de detección

p = Frecuencia "Uniforme" del OGM

m = Campos o lotes de semillas muestreados

s = Cantidad de Individuos o "2n" alelos muestreados por campo de cultivo o por lote de semilla.

De acuerdo a esta aproximación se calculó evaluar al menos 50 plantas por campo de cultivo, para obtener una probabilidad de detección del OVM del 95%, siempre que esté presente en una frecuencia mayor o igual al 0.05%.

Basados en esta aproximación, con 130 campos de cultivo y 50 plantas por cada campo, se tiene una probabilidad de detección del OVM del 96.13%, siempre que la frecuencia del OVM sea mayor o igual al 0.05%.



Dado que los reportes iniciales en el valle de Barranca indicaron una frecuencia del 33 al 62% de campos cultivados con OVM (donde la frecuencia del OVM en cada campo de cultivo es superior al 95%), los niveles de precisión determinados son más que adecuados.

El número de campos a evaluar por cada Comisión de Regantes fue establecido de acuerdo al número de campos existentes en cada comisión. Dichos datos fueron proporcionados por la Junta de Usuarios del Valle de Pativilca y de la Oficina de Información Agraria de Barranca (Tabla 3.a), que reportaron un total de 2100 campos de cultivo con intenciones de siembra de maíz para la campaña 2009-I y 2009-II.

Tabla 3.a. Campos de cultivo evaluados de acuerdo por cada comisión de regantes de la JUVP.

COMISION REGANTES	CAMPOS DE CULTIVO	ÁREA SEMBRADA (Ha)	CAMPOS EVALUADOS
ARAYA	152	281.39	9
CHACARITA PUERTO	145	379.17	9
GALPON	103	101.35	8
HUANCHAY	4	5.00	2
HUARANGAL ANTIVAL	115	54.22	7
HUAYTO	239	503.83	17
LA VEGA-OTOPONGO	163	147.89	7
LLAMACHUPAN	51	55.56	3
PARAMONGA	274	255.46	9
PAYCUAN	107	244.53	6
POTAO	212	447.33	11
PURMACANA	144	346.53	17
SAN NICOLAS	143	249.11	15
SANTA ELENA	45	111.63	3
VENADO MUERTO	38	77.84	1
VINTO	166	362.52	6
VALLE FORTALEZA			4
TOTAL	2101	3623.36	134

5. 2. Materiales y Metodología empleados en las Labores de Colecta

Además de realizar colectas en los 134 campos de cultivo, se obtuvo 9 muestras de granos de maíz provenientes de los centros de acopio (8 de empresas avícolas y 1 del centro de acopio local ANC), 15 muestras de mercados locales y 4 muestras de las empresas comercializadoras de semillas, haciendo un total de 162 muestras evaluadas (Tabla 3).

5.2.1. Materiales y equipos empleados:

- 3 Camionetas (Proporcionada por la A. A. de Barranca, La Junta de Usuarios del Valle de Pativilca y el Gobierno Regional de Lima).
- 2 Cámaras fotográficas (Proporcionada por el INIA y el Gobierno Regional de Lima).



- Mapas y Croquis (Proporcionados por la Junta de Usuarios del Valle de Pativilca).
- 3 GPS (Proporcionados por el INIA y el Gobierno Regional de Lima)
- Materiales para la colecta de hojas y granos de maíz: (Proporcionados por el INIA).
 - Bolsas de papel
 - Bolsas de plástico con cierre (Zip Lock).
 - Sílica gel
 - Tijeras
 - Alcohol
 - Algodón
 - Rótulos y Etiquetas
 - Fichas de colecta
- Cuadernos de campo

5.2.2. Metodología de Colecta de Hojas en Campo:

Se seleccionaron aleatoriamente los campos de cultivo a evaluar en cada Comisión de Regantes. Se colectaron 50 hojas por campo de cultivo de acuerdo al método zig-zag en una distancia mínima de una hectárea (Figura 5) tomando una hoja por planta.

Se obtuvo una porción de hoja por planta de maíz de aproximadamente 5-10 cm de longitud en cada planta seleccionada, tomando de preferencia la parte media de las hojas tiernas y sanas.

Luego, se depositaron los trozos de hojas provenientes de las 50 plantas de maíz en 2 bolsas de papel (25 muestras por bolsa), debidamente rotuladas con lápiz, indicando el número de muestra y la zona de colecta. Seguidamente, fueron depositadas en un recipiente conteniendo sílica gel hasta el momento de la extracción del ADN.

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

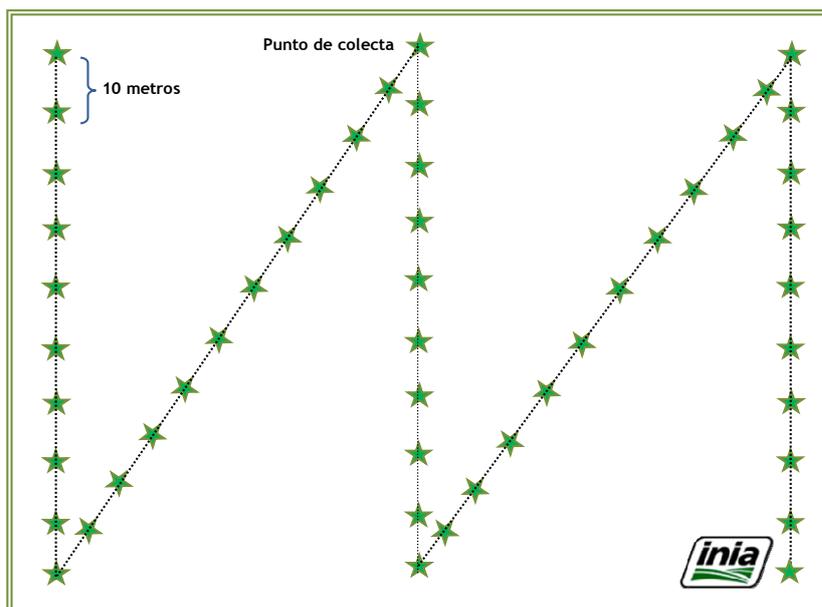


Figura 5. Diagrama del muestreo en campo para la colecta de hojas de maíz.

5.2.3. Metodología de Colecta de Granos:

Sólo para el caso de 4 campos de cultivos, donde no fue posible colectar hojas por estar en época de cosecha, se colectó un total de 2000 granos por cada campo. Para ello se seleccionaron aleatoriamente 100 mazorcas por cada campo y se obtuvieron 20 granos de cada una de las mazorcas seleccionadas (2 hileras por mazorca). Si se considera el hecho de que generalmente se obtienen de 2 a 3 mazorcas por planta, se habrían evaluado 50 plantas por campo de cultivo y basados en la probabilidad binomial se detectaría la presencia adventicia del OVM en una proporción mayor o igual a $p=0.005$ con un 99% de certeza.

Las muestras de granos procedentes de los mercados locales fueron obtenidas comercialmente, adquiriéndose 500 g (≈ 2100 granos de maíz) de los principales puntos de venta mayorista y minorista. Para este caso, se procedió a agruparlas en 3 submuestras de ≈ 700 semillas cada una. Basados en la probabilidad binomial, si las 3 submuestras mostraban resultados negativos en los análisis PCR, tendríamos un 95% de certeza de que el contenido de OGM es inferior al 1%. De similar manera, se procedió con el análisis de las muestras provenientes de los comercializadores de semillas (500 g ≈ 2100 semillas) y de los granos provenientes de los centros de acopio.

Las muestras de semillas obtenidas corresponden a las variedades híbridas Agrocerec 003 y Agrocerec 1596, las cuales fueron donadas por una empresa comercializadora de semillas.

En los centros de acopio de las empresas avícolas, se tomaron muestras de 2 lotes de granos. De cada lote se tomaron 4 muestras, cada una de 2 Kg. aproximadamente, las cuales fueron donadas por sus representantes. Para el caso del centro de acopio local, sólo se obtuvo una muestra de 500 g.



Tabla 3. Material biológico de maíz colectado en el valle de Barranca.

LUGAR DE COLECTA	UBICACIÓN	MUESTRAS TOMADAS	TIPO DE MUESTRA
CAMPOS DE CULTIVO	Araya	9	hoja y grano
	Chacarita Puerto	9	hoja
	Galpón	8	hoja
	Huanchay	2	hoja
	Huarangal Antival	7	hoja
	Huayto	17	hoja
	La Vega-Otopongo	7	hoja
	Llamachupan	3	hoja
	Paramonga	9	hoja
	Paycuan	6	hoja
	Potao	11	hoja
	Purmacana	17	hoja
	San Nicolás	15	hoja
	Santa Elena	3	hoja
	Venado Muerto	1	hoja
	Vinto	6	hoja
Valle Fortaleza	4	hoja y grano	
MERCADOS LOCALES	Mercado Antiguo	3	grano
	Mercado Modelo	5	grano
	Mercado La Paradita	7	grano
CENTROS DE ACOPIO	Centro de Acopio ANC	1	grano
	Empresa avícola	8	grano
SEMILLERAS	Empresa de semillas e insumos agrícolas	4	semilla
TOTAL		162	

5. 3. Metodología para la detección de OVM por PCR.

De acuerdo a los objetivos del presente trabajo, el análisis de las muestras colectadas se realizó en dos etapas, la primera denominada de barrido, cribado o “screening”, 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.

La segunda etapa consistió en la identificación de los eventos específicos que fueran reportados como cultivados en territorio nacional en estudios anteriores (Gutiérrez-Rosatti et al., 2008; Gutiérrez-Rosatti, 2009) tres de los cuales poseen la secuencia P35S y Tnos (BT11, NK603 y MON863) y uno de ellos (T25) sólo presenta la secuencia P35S.



5.3.1. Extracción, Cuantificación y preparación del ADN molde

La extracción de ADN a partir de hojas fue realizada por el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990) modificado en el INIA (Anexo 1). Para el caso de los granos se procedió de acuerdo a lo descrito en el manual de la Comisión Europea de la Dirección General del Centro común de Investigación, Instituto de la Salud y la Protección de los Consumidores (Comisión Europea, 2007).

Debido al número de hojas que fueron colectadas en cada campo, se procedió a realizar la extracción del ADN en grupos de 10 hojas, tomando aproximadamente 1 cm² de cada una de ellas. Por lo cual, se tuvo un total de 5 submuestras de ADN por cada campo de cultivo con su respectivo duplicado.

El ADN fue cuantificado automáticamente en el equipo Nanodrop 2000, por las relaciones espectrofotométricas estándar a 260 nm, 260/280 nm y 260/230 nm. La calidad del ADN fue visualizada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Sambrook y Russell, 2001).

Todas las muestras fueron uniformizadas a una concentración de 10 ng/μL aproximadamente para proceder a realizar la mezcla (bulk) de las 5 submuestras de ADN extraído por cada campo de cultivo, para su posterior empleo en la amplificación por PCR.

5.3.2. Amplificación PCR, Electroforesis y registro de resultados.

Los protocolos y programas de amplificación PCR cualitativa fueron estandarizados con el apoyo de una consultoría realizada por el Dr. Daniel Clark de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, tomando como referencia trabajos de investigación publicados en revistas científicas, tesis y/o base de datos (Tabla 4).



Tabla 4. Iniciadores utilizados para el análisis por PCR de las muestras de maíz colectadas en la provincia de Barranca.

TIPO DE INICIADOR	INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	ELEMENTO BLANCO	REFERENCIA
Endógeno	ZEIN01	TGCTTGCAATTGTCGCTCTCCTAG	329	Gen zeína	Chiueh et al., 2002; Rahman et al., 2007, GMDD
	ZEIN02	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT			
Screening	P35S F	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT	101	Promotor 35S	GMDD; Lee et al., 2004
	P35S R	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT			
	P35SL	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	195	Promotor 35S	Lin et al., 2000, GMDD
	P35SU	GCTCCTACAAATGCCATCA			
	Tnos F	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG	151	Secuencia de poliadenilación nos	GMDD; Lee et al., 2004
	Tnos R	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT			
Evento Específico	VW01	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG	170	Entre DNA de maíz y CaMV en maíz MON810	Tony A. 2004, GMDD
	VW03	TCCATCTTTGGGACCACTGTCTG			
	QTC1507-1F	GACGTCTCAATGTAATGGTTAACGA	83	Gen Pat y genoma de maíz TC1507	Yang et al. 2007
	QTC1507-1F	CCTAGTATATGAAAGAATGAAAAGGTGCTT			
	Cry1A(b) event 176-F	CGGCCCCGAGTTCACCTT	420	Gen Cry1Ab de maíz BT176	Dinon et al., 2010; Cardarelli et al., 2005; Zaulet et al., 2009
	Cry1A(b) event 176-R	CTGCTGGGGATGATGTTGTTG			
	E176 1-5-F	GTAGCAGACACCCCTCTCCACA	189	Entre promotor PEPC y gen Cry1A(b)	Onishi et al, 2005; Matsuoka et al, 2001
	Cry 1A 1-3-R	TCGTTGATGTTKGGGTTGTTGTCC			
	T25R3	TGAGCGAAACCCTATAAGAACC	209	Secuencia de poliadenilación CaMV en el gen PAT de maíz T24	Tony A. 2004, GMDD
	T25F7	ATGGTGGATGGCATGATGTTG			
	IVS2	CTGGGAGGCCAAGGTATCTAAT	189	Intrón IVS2 en el gen PAT del maíz BT11	Tony A. 2004, GMDD
	PATB	GCTGCTGTAGCTGGCCTAATCT			
	NK-R393	GAGAGATTGGAGATAAGAGATGGGTTT	231	Entre el gen de la proteína 70 y gen del péptido 2 del cloroplasto	Lee et al., 2004
	NK-F163	CCTCCTGATGGTATCTAGTATCTACCAACT			



Posteriormente, nuevos ensayos PCR múltiplex fueron estandarizados para el análisis de dos a tres iniciadores por reacción, según las condiciones señaladas en las tablas 5 y 6, con la finalidad de reducir los costos y el tiempo de análisis.

Tabla 5: Condiciones de Amplificación PCR para los ensayos múltiplex

Iniciadores	BUFFER PCR 10 X	dNTP	MgCl ₂	PRIMER	Volumen final	Taq Hot Start
ZEIN01-ZEIN02 P35S F-P35S R Tnos F-Tnos R	1.0 X	0.22 mM	1.5 mM	0.25 µM	25 µL	0.6 U
ZEIN01-ZEIN02 VW01-VW03 T25R3-T25F7	1.0 X	0.22 mM	1.5 mM	0.25 µM	25 µL	0.6 U
ZEIN01-ZEIN02 IVS2-PATB NK-R393-NK-F163	1.0 X	0.2 mM	1.5 mM	0.22 µM	25 µL	0.6 U
ZEIN01-ZEIN02 P35SL-P35SU	1.0 X	0.22 mM	1.0 mM	0.25 µM	25 µL	0.6 U
ZEIN01-ZEIN02 QTC1507-1F QTC1507-1F	1.0 X	0.2 mM	1.5 mM	0.3 µM	25 µL	0.6 U
ZEIN01-ZEIN02 Cry1A(b) event 176-F Cry1A(b) event 176-R E176 1-5-F Cry 1A 1-3-R	1.0 X	0.2 mM	1.5 mM	0.4 µM	25 µL	0.6 U

Los iniciadores utilizados fueron sintetizados por las empresas INVITROGEN e IDT. Todos los demás reactivos empleados en la amplificación PCR (Buffer PCR 10X, dNTP, MgCl₂, Taq polimerasa) provienen de la empresa QIAGEN.



Tabla 6: Programas de Amplificación PCR ensayos multiplex

Tipo de Ensayo	Iniciadores	Predenaturación		Denaturación		Annealing		Extensión		Extensión final	
		Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo
Screening	ZEIN01-ZEIN02 P35S F-P35S R	95	7 min.	94	30 s	60	45 s	72	30 s	72	7 min
	Tnos F-Tnos R	1 ciclo		40 ciclos						1 ciclo	
	ZEIN01-ZEIN02 P35SL-P35SU	95	7 min.	94	30 s	60	45 s	72	30 s	72	7 min
		1 ciclo		42 ciclos						1 ciclo	
Evento específico	ZEIN01-ZEIN02 VW01-VW03	95	7 min.	94	30 s	63	45 s	72	30 s	72	7 min
	T25R3-T25F7	1 ciclo		40 ciclos						1 ciclo	
	ZEIN01-ZEIN02 IVS2-PATB	95	7 min.	94	30 s	63	45 s	72	30 s	72	7 min
	NK-R393-NK-F163	1 ciclo		40 ciclos						1 ciclo	
	ZEIN01-ZEIN02 QTC1507-1F	95	7 min.	95	30 s	63	30 s	72	30 s	72	7 min
	QTC1507-1F	1 ciclo		38 ciclos						1 ciclo	
	ZEIN01-ZEIN02 Cry1A(b) 176-F	95	10 min.	95	30 s	64	60 s	72	60 s	72	7 min
	Cry1A(b) 176-R	1 ciclo		10 ciclos						1 ciclo	
	E176 1-5-F	95	10 min.	95	30 s	62	60 s	72	60 s	72	7 min
	Cry 1A 1-3-R	1 ciclo		28 ciclos						1 ciclo	

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, NK603, MON810, TC1507, 176 y T25 (Obtenidos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina, INTA).
- **Control de la amplificación del ADN:** Gen zeína (329 pb).
- **Control negativo:** Maíz amarillo duro INIA 611.
- **Blanco:** Master mix PCR sin ADN.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (120 voltios x 80 minutos) y visualizados por tinción con bromuro de etidio (0.3 µg/ml) y registrados con el fotodocumentador ChemiDoc™ XR.

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 100 pares de bases (Invitrogen: 1500 a 100 pb) y 50 pares de bases (Fermentas: 1031 a 50 pb).



Finalmente, se realizó el registro de la presencia o ausencia de la banda característica de los eventos específicos en los casos que hubiera lugar, para su incorporación en una base de datos.

5. 4. Metodología para la detección de OVM por inmunoensayos

La detección de OVM por inmunoensayos o tiras reactivas se realizó en campo del agricultor. Los kits para la detección de las proteínas Cry1Ab y CP4 EPSPS, correspondientes a los eventos específicos BT11 y NK603, fueron adquiridos comercialmente de la empresa Estrategic Diagnostic. Parte de los kits utilizados fueron generosamente donados por la empresa AGDIA.

Para ambos casos, se procedió de acuerdo a la metodología descrita en los respectivos manuales de uso (Anexo 3).



6. RESULTADOS.

6.1. Extracción, cuantificación y preparación del ADN molde

Se obtuvo un total de 127 muestras de ADN de hojas provenientes de campo de las 134 que fueron colectadas en campo (94.77%), cuyas concentraciones estuvieron en el rango de 20 a 150 ng/ μ L.

El ADN obtenido de las muestras de granos provenientes de los centros de acopio, mercados locales y comercializadoras de semillas tuvo una concentración de 40 a 130 ng/ μ L.

6.2. Amplificación PCR, electroforesis y registro de resultados.

6.2.1. Detección de las secuencias P35S y Tnos.

a. Muestras provenientes de campos de cultivo.

De las 127 muestras provenientes de campos de cultivo que amplificaron para la región del gen endógeno de maíz, un total de 16 amplificaron positivamente para la región P35S (101 pb) en las 3 repeticiones de los ensayos realizados; pero ninguna de las muestras amplificó la secuencia T nos (Figura 6), lo cual excluye la presencia de los eventos BT11 y MON863.

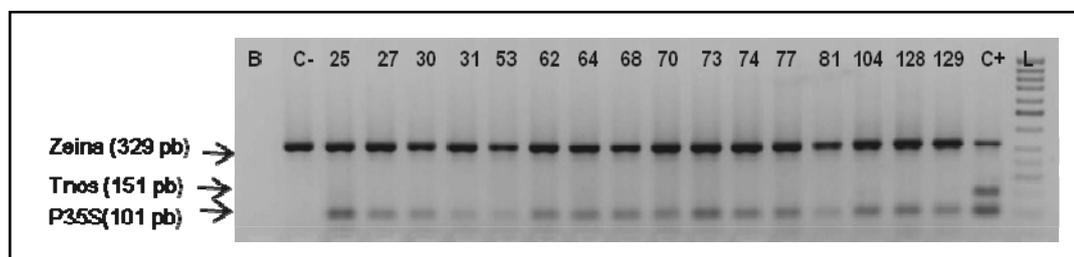


Figura 6. Perfiles electroforéticos para la detección de las secuencias P35S y T nos en muestras provenientes de campos de cultivo.

- Muestras de campos de cultivo: 25 al 129.
- C (-): Control negativo (Maíz INIA 611).
- C (+): Control positivo (BT11).
- B: Blanco.
- L: Escalera de 50 pb.

b. Muestras de granos provenientes de mercados locales.

De las 15 muestras colectadas en mercados locales, 4 de ellas mostraron resultados positivos para la presencia de la secuencia P35S en las 3 repeticiones de los ensayos realizados, pero fueron negativas para la presencia de la secuencia T nos (Figura 7).

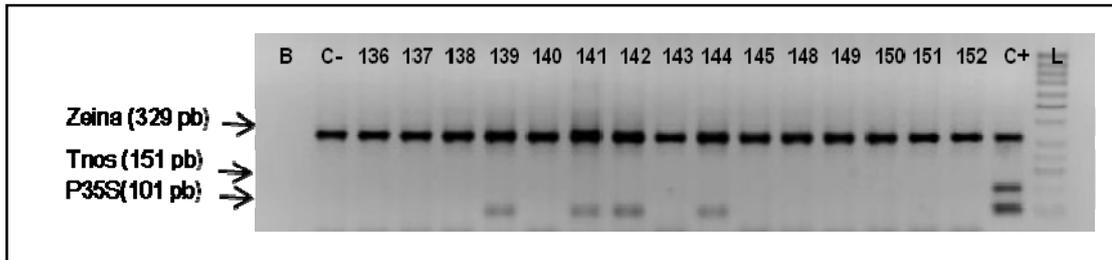


Figura 7. Perfiles electroforéticos para la detección de la secuencia P35S en muestras provenientes de mercados locales.

- Muestras de mercados locales: 136 al 152.
- C (-): Control negativo (Maíz INIA 611).
- C (+): Control positivo (BT11).
- B: Blanco.
- L: Escalera de 50 pb.

c. Muestras de granos provenientes de centros de acopio.

Las 8 muestras de granos provenientes de los centros de acopio de las empresas avícolas amplificaron tanto para la secuencia P35S como para la secuencia T nos (Figura 8). La muestra de grano procedente del centro de acopio local ANC no amplificó para las regiones evaluadas.

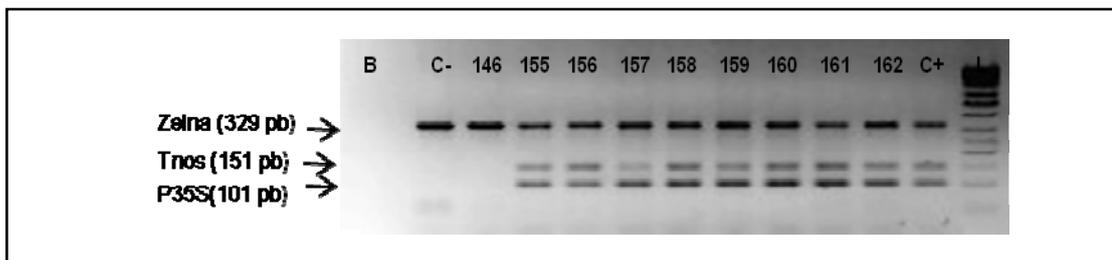


Figura 8. Perfiles electroforéticos para la detección de la secuencia P35S y T nos en muestras provenientes de centros de acopio de las empresas avícolas.

- Muestras de centros de acopio de empresas avícolas: 155 al 162
- Muestra de centro de acopio local: 146.
- C (-): Control negativo (Maíz INIA 611).
- C (+): Control positivo (BT11).
- B: Blanco.
- L: Escalera de 50 pb.

d. Muestras provenientes de empresas comercializadoras de semillas.

Las 4 muestras de semillas obtenidas de las empresas comercializadoras, no amplificaron para ninguna de las regiones evaluadas.



6.2.2. Detección de los eventos específicos BT11, NK603, T25, 176, TC1507 y MON810.

a. Muestras provenientes de campos de cultivo.

Ninguna de las 127 muestras provenientes de campos de cultivo, incluidas las 16 muestras que amplificaron la secuencia P35S, mostraron resultados positivos para la presencia de los eventos específicos BT11, NK603, T25, 176, TC1507 y MON810 en las 3 repeticiones de los ensayos realizados (Figura 9).

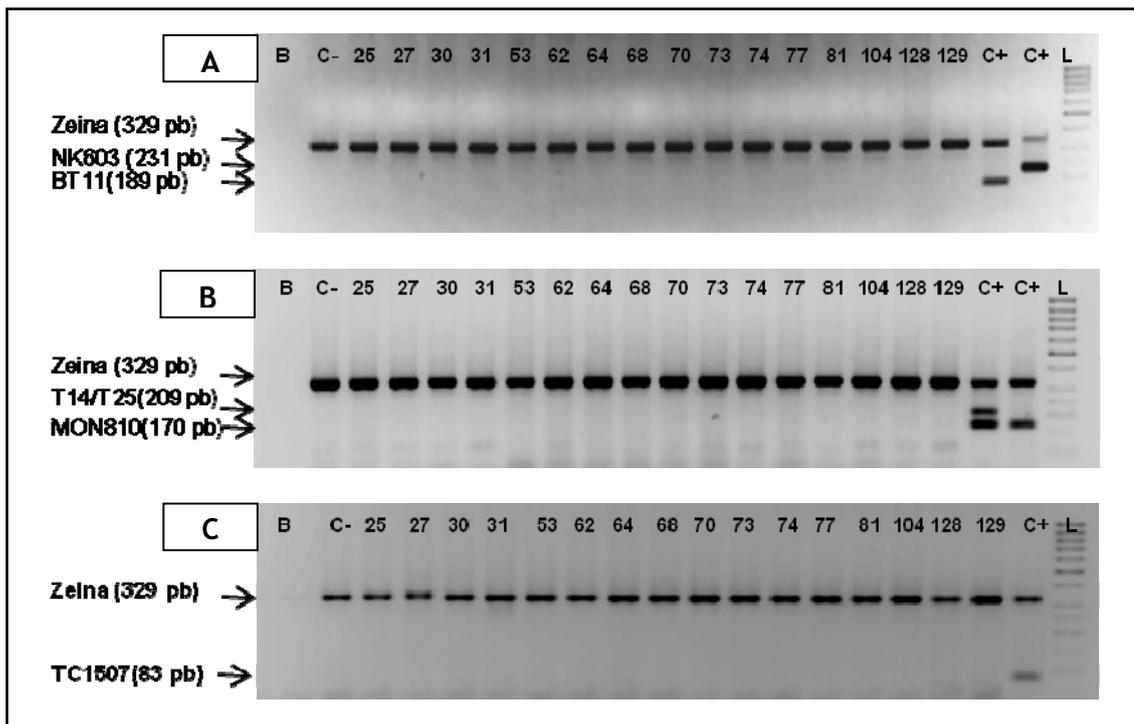


Figura 9. Perfiles electroforéticos para la detección de los eventos específicos: (A) NK603, BT11; (B) T25, MON810 y (C) TC 1507 en muestras provenientes de campos de cultivo.

- Muestras de campos de cultivo: 25 al 129.
- C (-): Control negativo (Maíz INIA 611).
- C (+): Controles positivos.
- B: Blanco.
- L: Escalera de 50 pb.

b. Muestras de granos provenientes de mercados locales.

No hubo resultados positivos para la presencia de los eventos específicos BT11, NK603, T25, 176, TC1507 y MON810 en las 3 repeticiones de los ensayos realizados en las 15 muestras de granos procedentes de mercados locales, incluidas las 4 muestras que amplificaron la secuencia P35S (Figura 10).

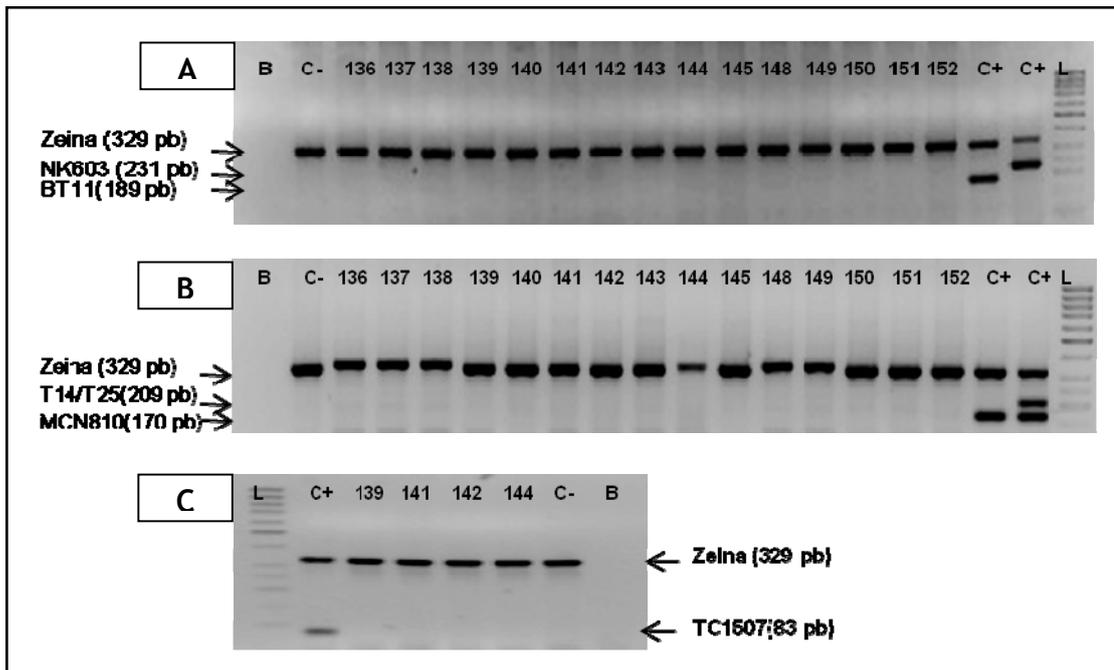


Figura 10. Perfiles electroforéticos para la detección de los eventos específicos: (A) NK603, BT11; (B) T25, MON810 y (C) TC 1507 en muestras de granos provenientes de mercados locales.

- Muestras de granos de mercados locales: 136 al 152.
- C (-): Control negativo (Maíz INIA 611).
- C (+): Controles positivos.
- B: Blanco.
- L: Escalera de 50 pb.

c. Muestras de granos provenientes de centros de acopio.

De las 8 muestras de granos provenientes de los centros de acopio de las empresas avícolas, 5 de ellas amplificaron para el evento T25 y las 8 muestras amplificaron para los eventos NK603 y MON810 (Figura 11). Los eventos 176 y BT11 no fueron hallados. La muestra de grano procedente del centro de acopio local ANC no amplificó para ninguno de los 6 eventos específicos evaluados.

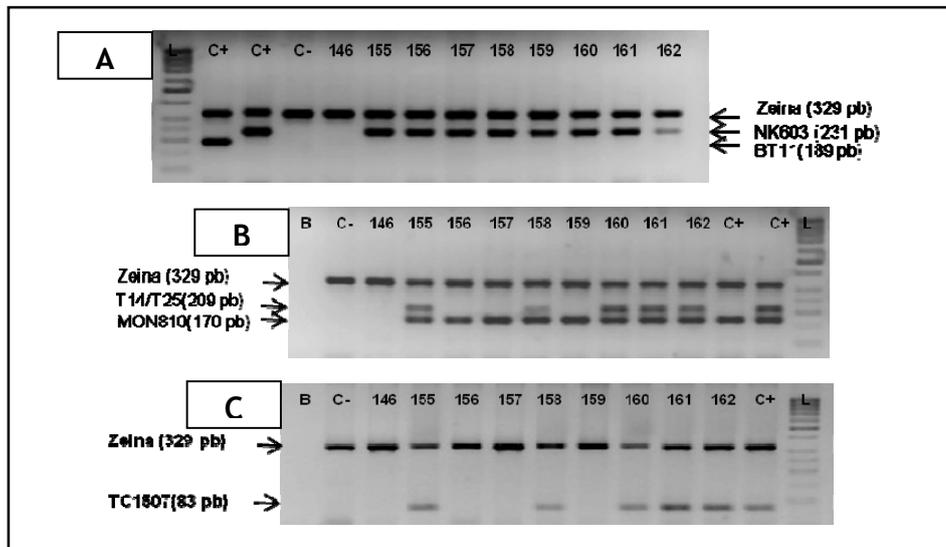


Figura 11. Perfiles electroforéticos para la detección de los eventos específicos: (A) NK603, BT11; (B) T25, MON810 y (C) TC 1507 en muestras de granos provenientes de centros de acopio.

- Muestras de centros de acopio de empresas avícolas: 155 al 162
- Muestra de centro de acopio local: 146.
- C (-): Control negativo (Maíz INIA 611).
- C (+): Controles positivos.
- B: Blanco.
- L: Escalera de 50 pb.

Tabla 7. Muestras positivas en el análisis PCR para las secuencias evaluadas en las muestras de maíz colectadas en Barranca.

LUGAR DE COLECTA	SCREENING		DETECCIÓN DE EVENTOS ESPECÍFICOS					
	Tnos	P35S	T25	MON810	NK603	BT11	176	TC 1507
Campos de cultivo	0	16	0	0	0	0	0	0
Mercados locales	0	4	0	0	0	0	0	0
Centro de acopio local	0	0	0	0	0	0	0	0
Centros de acopio empresas avícolas	8	8	5	8	8	0	0	5
Comercializadoras de Semillas	0	0	0	0	0	0	0	0

7.3. Detección de los eventos específicos BT11 y NK603 por inmunoensayos

No hubo resultados positivos en el análisis de campo realizado para la detección de los eventos específicos BT11 y NK603 realizado con tiras reactivas en los campos de cultivo evaluados.

Para validar la funcionalidad de las tiras reactivas utilizadas se procedió a emplearlas con los controles positivos NK603 y BT11, utilizando como control negativo la variedad de maíz INIA 611 produciendo los resultados esperados (Figura 12).

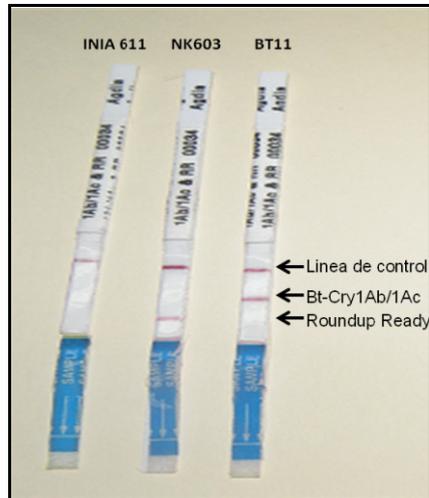


Figura 12: Verificación de la funcionalidad de las tiras reactivas para la detección de OVM.

7. DISCUSIÓN

a. Presencia de transgenes en variedades o razas criollas de maíz en el valle de Barranca.

El valle de Barranca es una zona agrícola dedicada principalmente al cultivo de maíz amarillo duro, donde la gran parte de los campos evaluados (93,3%) estaban cultivados con híbridos de maíz amarillo duro, correspondientes a las variedades comerciales Agricol, Agrocere, Dekald, Pioneer, Hortus e Inti.

Aquellos híbridos comerciales de maíz amarillo duro que ya no producen buenos rendimientos en grano, son destinados para forraje y constituyeron el 4,5% de las muestras colectadas como maíz “chala”.

De los 134 campos de cultivo seleccionados aleatoriamente para la colecta, sólo 3 contenían variedades o razas locales de maíz (2,2%), 2 de ellas correspondientes a maíz choclo y 1 a maíz morado cuyas semillas son obtenidas de los mercados locales y/o son conservadas por el agricultor.

Los reportes de introgresión de transgenes en cultivares nativos de maíz, a los cuales hace referencia el Punto Focal Nacional en Bioseguridad, no pudieron ser hallados en la página web del BCH. Los únicos reportes de los cuales se tiene conocimiento son los publicados por la Dra. Gutiérrez y corresponden a muestras de maíz amarillo duro.

Los resultados de la presencia de transgenes en los reportes mencionados no hacen referencia alguna a variedades criollas de maíz; por lo tanto, no existen siquiera indicios o evidencias de una posible hibridación entre las razas criollas de maíz y variedades genéticamente



modificadas. Es más improbable aun la existencia de reportes sobre la posible introgresión de transgenes en las razas nativas de maíz del Perú.

Estudios anteriores han demostrado que el flujo de polen desde los híbridos hacia las variedades locales de maíz es un suceso común en la costa del país. Sin embargo, los agricultores al seleccionar su semilla conservan la pureza varietal de sus variedades de maíz que tienen usos especiales como chicha o choclo (Sevilla, 2005). Las semillas provenientes de la fecundación de los híbridos de maíz amarillo duro son fácilmente distinguibles por el efecto xenia y descartadas como semilla.

b. Detección de las secuencias P35S, Tnos y eventos específicos

Las 7 muestras de ADN que fueron inviábiles al análisis PCR corresponden en su mayoría a las muestras de hojas colectadas en campos de cultivo en época de cosecha. El grado de deterioro de estas hojas no permitió obtener ADN con la calidad y concentración adecuadas. A pesar de ello, nuestra probabilidad de detección del OVM fue del 95.82%, siempre que la frecuencia del OVM sea mayor o igual al 0.05%.

Las 16 muestras provenientes de campo de cultivo y 4 de mercados locales muestran bandas tenues, comparadas a las bandas bien definidas obtenidas de las muestras de los centros de acopio de las empresas avícolas, para la secuencia correspondiente al promotor 35S.

Inicialmente, sólo se planificó evaluar la presencia de los eventos BT11 y NK603, los cuales son ampliamente distribuidos a nivel mundial y además fueron reportados como cultivados en el valle de Barranca en estudios previos (Gutiérrez-Rosatti et al., 2008). Al no detectar dichos eventos en las muestras analizadas, se decidió ampliar el número de eventos específicos a examinar, principalmente de aquellos que poseen la secuencia P35S y no presentan la secuencia Tnos.

Al no haber sido detectada la secuencia Tnos en las muestras provenientes de campos de cultivo y de mercados locales, los eventos MON863 y GA21 no fueron considerados en el análisis posterior para la identificación de eventos específicos, puesto que ambos eventos poseen la secuencia Tnos.

De acuerdo a nuestros resultados de barrido, se completó el análisis PCR con la evaluación de la presencia de los eventos MON 810, T25, TC1507 y 176 que cumplen la condición de poseer la secuencia P35S y ausente la secuencia Tnos, para descartar la presencia de falsos positivos.

El evento DBt418 no fue incluido en el análisis, puesto que actualmente no está disponible comercialmente y por tanto, no se cuenta con material de referencia para su identificación (Jorge Vivanco, comunicación personal).

La posible explicación para las 16 muestras provenientes de campos de cultivo que amplifican la región P35S, sería la presencia de falsos positivos debido a la presencia del virus del mosaico de la coliflor "CaMV" en las muestras colectadas, tal cual fuera reportado en diversos estudios realizados (Wolf et al., 2000; Holden et al., 2009).



Otra posible explicación sería una leve contaminación en el laboratorio. Sin embargo, los controles negativos en la amplificación PCR no dieron resultados positivos en ningún ensayo realizado; por la cual, esta posibilidad estaría descartada.

Debido a la gran demanda de granos de maíz por parte de la industria avícola, era previsible detectar la presencia de eventos transgénicos en las muestras colectadas en sus centros de acopio, puesto que generalmente se importa dicho insumo de países productores de OVM como Argentina y Estados Unidos.

8. CONCLUSIONES

Debido a nuestra probabilidad de detección del 95.82% y un nivel de confianza del 95%, podemos concluir que no existen campos cultivados con variedades de maíz transgénico que fueran reportadas como existentes en el valle de Barranca.

No se ha detectado la presencia de los eventos específicos BT11 y NK603 en las pruebas de inmunoensayos realizadas en los campos de los agricultores de Barranca.

No se ha detectado la presencia de los eventos específicos T25, BT11, NK603, MON810, 176 y TC1507 en los análisis por PCR realizados en las muestras procedentes de 127 campos de cultivo del valle de Barranca, 15 muestras de mercados locales, 1 muestra del centro de acopio local y 4 muestras de las empresas comercializadoras de semillas.

Como era previsible, fueron detectados 4 eventos: T25, NK603, MON810, TC1507 en las muestras de granos provenientes de los centros de acopio de las empresas avícolas, puesto que dichas empresas son las principales importadoras de grano de maíz a granel procedente de países productores de OVM como Argentina y Estados Unidos.



AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Felipe de Mendiburu, por el apoyo en el análisis estadístico.
- Al Dr. Ricardo Sevilla del Instituto Nacional de Innovación Agraria, por la revisión de la distribución espacial de las variedades criollas de maíz.
- A los distinguidos revisores nacionales e internacionales por sus aportes y sugerencias en el desarrollo del presente trabajo



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez, A. 2002. Transgenes in maize landraces in Oaxaca: Official report on the extent and implications. Poster. The 7th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, Universidad de Pekín, China.

Análisis de riesgo a la biodiversidad por organismos vivos modificados (OVM). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D.F. actualización: diciembre 2008. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/doctos/analisis.html>

Biogeomancer research consortium. University of California. “Biogeomancer workbench”. creación: marzo 2003, actualización: junio 2010. Disponible en: <http://bg.berkeley.edu/latest/#5%40home%3F>

Cardarelli, P.; M. Branquinho; R. Ferreira; F. da Cruz y A. Gemal. 2005. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. Food Control. Vol. 16: 859 - 866.

Center for Environmental Risk Assessment (CERA) .ILSI Research Foundation, International Life Sciences Institute. www.cera-gmc.org

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.

Cleveland, D.; D. Soleri; F. Aragón-Cuevas; J. Crossa y P. Gepts. 2005. Detecting (trans)gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico Environ. Biosafety Res. 4: 197-208.

Cochran, W. G. 1977. Sampling techniques, 3^o ed., New York. John Wiley & Sons.

Comisión Europea de la Dirección General del Centro Común de Investigación, Instituto de la Salud y la Protección de los Consumidores. 2007. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Luxemburgo. 238 pp.

Christou, P. 2002. No credible scientific evidence is presented to support claims that transgenic DNA was introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Transgenic Research 11: iiiv, 2002.

Dinon, A.; K. Bosco y A. Arisi. 2010. Monitoring of Bt11 and Bt176 genetically modified maize in food sold commercially in Brazil from 2005 to 2007. Journal of the Science of Food and Agriculture. 90: 1566 - 1569.

Doyle, J. and J. Doyle. 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Eastham, K. y J. Sweet. 2002. Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental issue report N° 28. European Environment Agency. Germany.



Galindo Castro, I. 2007. Detección de organismos genéticamente modificados (OGMs) en Venezuela. Comp. Fac. Agron. Conferencia.

GMO Detection Method Database (GMDD), GMO Detection Laboratory, Shanghai Jiao Tong University. www.gmdd.shgmo.org

Grobman, A. 1967. Tripsacum in Peru. Bot. Mus. Harvard University 21: 285-287.

Grobman, A.; W. Salhuana y R. Sevilla. 1961. Races of Maize in Peru. Nat. Ac. of Science. Nat. Research Council. Pub. 915. Washington, USA.

Gutiérrez-Rosatti, A.; P.D. Poggi; G.M. Gálvez y R.R. Cáceres. 2008. Investigaciones sobre la presencia de transgenes en Perú: caso maíz (*Zea mays* L.). Revista Latinoamericana de Genética. 2º época, vol. I, Nº 1. pags. G.V. 89.

Gutiérrez-Rosatti, A., 2009. Informe: Monitoreo de Transgenes en Cosechas Nacionales de Maíz Amarillo Duro- Año 2008.

Disponible en: <http://pe.biosafetyclearinghouse.net/actividades/2009/reporte2.pdf>

Hidalgo, O.; W. Roca; E.N. Fernández-Northcote (eds.). 2005. Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales. Casos: Algodón, Leguminosas de grano, Maíz y Papa. Consejo Nacional del Ambiente. Lima, Perú. 111 p.

Hijmans, R. J., L. Guarino, C. Bussink, P. Mathur, M. Cruz, I. Barrentes, E. Rojas. 2004. DIVA-GIS (versión 5.0). A geographic information system for the analysis of species distribution data. Disponible en <http://www.diva-gis.org>.

Holden, M. J.; M. Levine; T. Scholdberg; R. J. Haynes y G.Jenkins. 2009. The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. Anal Bioanal Chem. DOI 10.1007/s00216-009-3186-x.

James, Clive. 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Ithaca, New York.

Kaplinsky, N.; D. Braun; D. Lisch; A. Hay, S. Hake and Michael Freeling. 2002. Maize transgene results in Mexico are artefacts. Nature 416: 601-602.

Kato, T.A.; C. Mapes; L.M. Mera; J.A. Serratos; R.A. Bye. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 pp. México, D.F.

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.



Lin H.; L. Chiueh y D. Yang-Chih Shih. 2000. Detection of genetically Modified Soyabeans and Maize by the polymerase Chain Reaction Method. *Journal of Food and Drug Analysis*. 8 (3): 200-207.

Lockwood, D.; C. Richards y G. Volk. 2007. Probabilistic models for collecting genetic diversity: comparisons, caveats, and limitations. *Crop Science* 47: 861-868.

Luna, N. 2009. Los transgénicos se acercan más, publicado en *Diario El Comercio*, 13 de julio 2007. Sección En Campaña a2. Lima, Perú.

<http://elcomercio.pe/impres/otas/transgenicos-se-acercan-mas/20090713/313337>

Mangelsdorf, P. 1974. *Corn: Its origin, evolution and improvement*. The Belknap press of Harvard Univ. Press. Cambridge, Massachusetts. USA.

Matsuoka, T.; H. Kuribara; H. Akiyama; H. Miura; Y. Goda; Y. Kusakabe y K. Isshiki. 2001. A Multiplex PCR Method of detecting Recombinant DNAs from Five Lines of Genetically Modified Maize. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 42 (1): 24-32.

Metz, M. and J. Fütterer. 2002. Suspect evidence of transgenic contamination. *Nature* 416: 602, 2002.

Morisset, D.; T. Demsar, K. Gruden, J. Vojvoda, D. Stebih y J. Zel. 2009. Detection of genetically modified organisms-closing the gaps. *Nature Biotechnology* 27 (8): 700-701.

Onishi, M.; T. Matsuoka; T. Kodama; K. Kashiwaba; S. Futo; H. Akiyama; T. Maitani; S. Furui; T. Oguchi y A. Hino. 2005. Development of a multiplex Polymerase Chain Reaction Method for Simultaneous Detection of Eight Events of Genetically Modified Maize. *J. Agric. Food Chem.* 53 (25): 9713 - 9721.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2003. *Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize)*. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 27. París, France.

Ortiz-García, S.; E. Ecurra; B. Schoel; F. Acevedo; J. Soberón; A. A. Snow. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003-2005). *Proc. Nat. Acad. Sciences*, vol. 102, nº 35, pag. 12338-12343.

Ortiz, M. 2007. En el valle de Barranca ya existen cultivos transgénicos, publicado en *Diario El Comercio*, 17 de noviembre 2007. Sección Economía b3. Lima, Perú.

http://elcomercio.pe/edicionimpresa/Html/2007-11-7/en_el_valle_de_barranca_ya_exi.html

Pastor, S. 2009. Opinión técnica sobre proyecto de ley que declara una moratoria al ingreso de organismos vivos modificados al territorio nacional por diez (10) años. Informe Técnico N° 40-2009-SPS-DGDB-VMDERN-MINAM.pag.5.

<http://pe.biosafetyclearinghouse.net/actividades/2010/opley/opl3599.pdf>

Piñeyro-Nelson, A.; J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernández, A. Rangel, M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante y E.R. Álvarez-



- Buylla. 2008.** Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology* 18: 750-761.
- Quist, D. and Chapela, I. 2001.** Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca. *Nature*, vol. 414, pag. 541-543. Mexico.
- Remund, K.; D. Dixon; D. Wright y L. R. Holden. 2001.** Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Research* 11: 101-119.
- 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.
- Rudi, K.; I. Rud y A. Holck. 2003.** A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Research* 31: 11, e62.
- Sambrook, J. y D. Russell. 2001.** *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3^o ed. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, Estados Unidos.
- Schoel y Fagan. 2009.** Insufficient evidence for discovery of transgenes in Mexican landraces. *Molecular Ecology* 18: 4143-4144.
- Sevilla, R. 2005.** Magnitud e impacto potencial de la liberación de los organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales. Caso: Maíz. p. 41-61. En: O. Hidalgo; W. Roca; E.N. Fernández-Northcote (eds.). *Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales: Casos Algodón, Leguminosas de grano, Maíz y Papa.* Consejo Nacional del Ambiente. Lima, Perú.
- Tony Ahmed Marzok, M. A. 2004.** Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize in Egypt as well as Comparative Nutritional Safety Investigations of Isogenic and Transgenic (Bt) Maize in Broiler Nutrition: Broiler Performance, Degradation and Metabolic Fate of Maize DNA in some Tissues and Organs. Thesis submitted for the fulfilment of a doctor degree in veterinary medicine. Faculty of Veterinary Medicine, Free University, Berlin. 137 pp.
- Universidad Nacional Agraria La Molina (1986).** Catálogo de Recursos Genéticos de Maíz de Sudamérica: Perú. Programa Cooperativo de Investigaciones en Maíz. UNALM, Lima, Perú.
- Wolf, C.; Scherzin y Lüthy J. 2000.** Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur. Food Res. Technol.* 210: 367-372.
- Yang, L.; J. Guo; A. Pan; H. Zhang; K. Zhang; Z. Wang y D. Zhang. 2007.** Event-Specific Quantitative Detection of Nine Genetically Modified Maizes Using One Novel Standard Reference Molecule. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (1): 15 - 24.
- Zaulet, M.; L. Rusu; S. Kevorkian; C. Luca; S. Mihacea; E. M. Badea y M. Costache. 2009.** Detection and quantification of GMO and sequencing of the DNA amplified products. *Romanian Biotechnological Letters* 14 (5): 4733 - 4746.



NORMAS CITADAS

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. 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

PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN SEGÚN EL MÉTODO CTAB (CIP, 1997), MODIFICADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA SUDIRGEB-INIA

1. Tomar la muestra de hojas, triturar el tejido con nitrógeno líquido, en morteros pre-enfriados, hasta obtener un polvo fino.
2. Con una espátula pre-enfriada, transferir el polvo a un tubo de 2.0 mL; luego agregar 700 μ L de tampón CTAB. 2X y 2 μ L de B-mercaptoetanol, mezclar.
3. Incubar las muestras en baño maría a 65 °C durante 45 min. agitándolas suavemente cada 15 min.
4. Dejar las muestras a temperatura ambiente por 2 min.
5. Agregar 700 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Mezclar suavemente, por inversión.
6. Centrifugar las muestras durante 5 min. a 14000 rpm. Transferir el sobrenadante a un tubo de 2 mL nuevo. Tener cuidado de no absorber la interface. Descartar el cloroformo/alcohol isoamílico remanente.
7. Agregar 60 μ L de tampón CTAB 10 X (en NaCl 0.7), agitar suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.
8. Añadir 150 μ L Acetato de Potasio 3M, luego agitar suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.
9. Repetir los pasos 5 y 6.
10. Agregar 500 μ L de isopropanol frío a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejarlos en refrigeración por 15 min. a -20 °C.
11. Centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 20 min. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante para no perder el precipitado de ADN. Dejar que el precipitado se seque invirtiendo los tubos abiertos durante 2 min.
12. Lavar 2 veces el precipitado de ADN en 600 μ L de etanol al 70%, centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 30 min, por cada lavado, y eliminar el etanol.
13. Lavar el precipitado de ADN en 600 μ L de etanol al 90%, centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 30 min. y eliminar el etanol.
14. Permitir que el precipitado se seque toda la noche dejando los tubos abiertos invertidos.
15. Disolver el precipitado de ADN en 100 μ L de T10E1.



16. Agregar 1 μL de ARNasa 10 mg/ml, agitar suavemente e incubar las muestras a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h.
17. Almacenar las muestras a 4 $^{\circ}\text{C}$ a mediano plazo o a 20 $^{\circ}\text{C}$ a largo plazo.

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN, SEGÚN EL MANUAL DE LA COMISIÓN EUROPEA DE LA DIRECCIÓN GENERAL DEL CENTRO COMÚN DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO DE LA SALUD Y LA PROTECCIÓN DE LOS CONSUMIDORES (2007).

1. Depositar 100 mg de muestra homogénea en un tubo estéril de 1,5 ml para microcentrífuga;
2. añadir 300 μl de agua desionizada estéril y mezclar con un asa;
3. añadir 500 μl de tampón a base de CTAB y mezclar con un asa;
4. añadir 20 μL de proteinasa K (20 GM/ml), agitar e incubar a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 30-90 minutos;
5. añadir 20 μl de ribonucleasa A (10 GM/ml), agitar e incubar a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 5-10 minutos;
6. centrifugar durante 10 minutos a 16 000 g aproximadamente;
7. trasladar el sobrenadante a un tubo de microcentrifugación que contenga 500 μl de cloroformo y agitar durante 30 segundos;
8. centrifugar durante 10 minutos a 16,000 g hasta que se separen las fases;
9. trasladar 500 μl de la capa superior a otro tubo de microcentrifugación que contenga 500 μl de cloroformo y agitar;
10. centrifugar durante 5 minutos a 16 000 g;
11. trasladar la capa superior a otro tubo de microcentrifugación;
12. añadir 2 volúmenes de solución de precipitación a base de CTAB y mezclar pipeteando;
13. incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente;
14. centrifugar durante 5 minutos a 16 000 g;
15. desechar el sobrenadante;
16. disolver el precipitado en 350 μl NaCl (1,2 M);



17. añadir 350 µl de cloroformo y agitar durante 30 segundos;
18. centrifugar durante 10 minutos a 16,000 g hasta que se separen las fases;
19. trasladar la capa superior a otro tubo de microcentrifugación;
20. añadir 0,6 volúmenes de isopropanol y agitar;
21. centrifugar durante 10 minutos a 16 000 g;
22. desechar el sobrenadante;
23. añadir 500 µl de solución de etanol al 70 % y agitar con cuidado;
24. centrifugar durante 10 minutos a 16 000 g;
25. desechar el sobrenadante;
26. secar los sedimentos y volver a disolver el ADN en 100 µl de agua desionizada estéril.

ANEXO 3

Descripción del procedimiento de detección de proteínas recombinantes según el manual del KIT de Strategic Diagnostic Inc.

1. Colocar la hoja entre la tapa y el cuerpo del tubo de 1.5 ml y coloque la tapa en su lugar.
2. Abrir la tapa y remover el exceso de tejido vegetal de alrededor del tubo
3. Colocar los discos de tejido vegetal dentro del tubo con un agitador (esto provee cerca de 10 a 20 mg de tejido vegetal. La cantidad apropiada de tejido puede ser obtenida por otros medios)
4. Añadir 0.5 ml (por la parte superior de la tapa del tubo) de agua al tubo que contiene la muestra de hoja.
5. Macerar el tejido vegetal con un agitador limpio por aproximadamente un minuto.
6. Colocar la tira de flujo lateral dentro del tubo que contiene el extracto de la muestra de hoja. Las flechas sobre la cubierta del filtro deben apuntar hacia adentro del tubo. Permitir que la tira permanezca dentro del tubo en posición vertical por 5 minutos.
7. Proceder con la interpretación.



Descripción del procedimiento de detección de proteínas recombinantes según el manual de AGDIA.

Bt-Cry1Ab/1Ac ImmunoStrip® Test

Strip tests for the detection of Bt-Cry1Ab and Bt-Cry1Ac protein
 Catalog no. STX 06200

CONTENTS

Size	Item	Quantity
0050	ImmunoStrip®	50 strips
	Sample extract buffer (required)	Sold separately
	Instructions	1
0008	ImmunoStrip® Comb, 12 strips per comb	8 combs
	Sample extract buffer (required)	Sold separately
	Instructions	1
0012	ImmunoStrip® Comb, 8 strips per comb	12 combs
	Sample extract buffer (required)	Sold separately
	Instructions	1

STORAGE

Keep the strips tightly sealed in the container with the desiccant at all times. Store container in the refrigerator (4°C) between uses. The sample buffer should also be refrigerated (4°C) when not in use.

YOU WILL NEED

Micropipettes
 Micropipette tips
 Graduated cylinder
 Balance 1-500 gms
 Scissors and a pen
 Grinding equipment:
 Blender (Osterizer®, Sunbeam Corporation Model No. 6641, 1-800-597-5978)
 Blender jars 1000ml, Nalgene ("Mason" type, Fisher Scientific Catalog No. 2115-1000)
 Blender blade pack assembly (Factory Services Inc. Catalog No. OC-DUX, 1-800-237-8699)
 Threaded bottom cap (Factory Services Inc. Catalog No. C/JN)
 Plastic extraction bottles 1000ml
 Sample tube rack
 Microtuge tubes
 Sample extraction bags (Agdia Catalog No. ACC 00930)

SAFETY

Sample buffer and strip tests are non-hazardous.

Bt-Cry1Ab/1Ac ImmunoStrip® Test

Strip tests for the detection of Bt-Cry1Ab and Bt-Cry1Ac protein
 Catalog no. STX 06200

INTENDED USE

This kit is intended for seed quality purposes to determine the presence of the Bt-Cry1Ab or Bt-Cry1Ac protein in seed and leaves of corn, cotton, and other crops. The expression of Bt-Cry1Ab or Bt-Cry1Ac transgenic protein in plants results in insect resistance. This test is suitable for testing both leaf tissue and seed of corn, cotton, and other crops.

SAMPLE PREPARATION

Leaves, seedlings, or seeds must be ground and diluted in SEB4 sample extraction buffer. For best results, samples should be diluted in SEB4 buffer according to the ratios listed in the table below. After samples have been ground in buffer, let the extract sit for at least 30 seconds before testing with the ImmunoStrip.

Crop	LEAF to SEB4 buffer ratio (weight/volume)	SEED to SEB4 buffer ratio (weight/volume)
Corn	1:20	1:2
Cotton	1:20	1:10

Leaf extraction

For leaf samples use Agdia's disposable sample extraction bags, a clean mortar and pestle, or any other grinding device to help extract samples.

Individual leaves

A simple method for grinding a single leaf sample is by using Agdia's special sample extraction bags. Bags are available filled with buffer (Catalog No. ACC 00958) or empty (Catalog No. ACC 00930). Use only one sample per bag and be sure to label each bag. Add the appropriate volume of buffer to an empty bag or open one of the filled bags. Each filled bag contains 3 ml of sample buffer. Therefore, a recommended 1:20 dilution would require about a 0.15 g leaf sample. Place the sample between the mesh linings of the pouch. Rub the pouch with a pen to completely crush the sample and to mix the contents uniformly.

Multiple leaves

For composite leaf samples, taking a representative leaf disc or leaf punch is recommended. Stack the leaves on a clean surface and using a No. 2 cork borer (Fisher Scientific Catalog No. 07-854C) punch through the leaves. Dislodge the discs into Agdia's disposable sample extraction bags and extract in buffer according to the recommended ratios. The weight of the discs varies with the growing conditions, age, and variety of the plant. Determine the average weight of discs and add the appropriate volume of SEB4 buffer.

Crop	Leaf to SEB4 buffer ratio (weight/volume)	Approximate weight	Volume of SEB4 Buffer
Corn	1:20	0.2 grams	4 ml
Cotton	1:20	0.2 grams	4 ml

Sample grinding in Agdia sample extraction bags



Cork borer and leaf disc





Bt-Cry1Ab/1Ac ImmunoStrip® Test
Strip tests for the detection of Bt-Cry1Ab and Bt-Cry1Ac protein
Catalog no. STX 06200

RESULTS

Control line

Test line
if line appears,
test is positive.

Positive (+)

Control line

Test line
No line,
test is negative.

Negative (-)

The control line will appear in 3 to 5 minutes. Maximum reaction occurs in 30 minutes at which time the ImmunoStrip should be removed from the buffer. The control line assures that the test is working properly. If the control line does not appear, the test is invalid. Depending on the flow characteristics of the sample, the time to develop the signal may vary.

If the sample is positive, the test line will also appear. If the sample is negative, the test line will not appear.

If you wish to keep the strips as permanent records cut off the sample pads and blot the ImmunoStrips between paper towels. This prevents any liquid still in the sample pads from interfering with results.

LIMITATIONS

The following is a description of factors that could limit test performance or interfere with proper test results.

- **Expiration:** Test should be used within 1 year of purchase.
- **Temperature:** Optimal test results will occur when the test is run in an environment where the temperature is between 60° and 95° F (15° and 35° C).
- **Storage:** Test results may be weak or the test may fail if the storage instructions are not followed properly. If the ImmunoStrip package is left open too long, the strips may absorb moisture. This may affect test results.
- **Sample Dilution:** Strip performance is very dependent on the proper sample dilution. The strip will not properly absorb sample extracts containing large amounts of tissue.
- **Submerging the strip:** Test strips must not be submerged more than 0.5 cm or ¼ inch. If too much of the strip is submerged, certain components of the strip are released into the sample instead of being wicked upward by the strip. This most often results in a failed test in which no control line forms.