



MINISTERIO
DE AGRICULTURA
Y RIEGO



Instituto Nacional de Innovación Agraria

“Acciones de Vigilancia y Supervisión en el Valle Chancay-Lambayeque a fin de detectar la posible presencia de cultivos ilegales de maíz transgénico”

REGULACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LA BIOTECNOLOGÍA AGRARIA

MARZO, 2016



ANTECEDENTES:

- ▶ El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), a través del Componente Regulación de la Seguridad de Biotecnología Agraria (CRSBA), viene realizando desde el año 2009 acciones de supervisión y vigilancia en campos de cultivo de maíz y soya, a fin de localizar e identificar la posible presencia no autorizada de cultivos transgénicos en el territorio nacional.
- ▶ Hasta la fecha, se han realizado 6 inspecciones en campos de cultivo de las regiones de Lima, Lambayeque y Amazonas.

BASE LEGAL

Estas acciones son realizadas conforme al marco legal vigente en materia de Bioseguridad:

- ✓ Ley 27104 y su Reglamento (D.S. 108-2002-PCM), D.S. 011-2011-AG
- ✓ Ley 29811 y su Reglamento (D.S. 008-2012-MINAM).



OBJETIVOS:

- a) **Evaluar cualitativamente la presencia de cultivos de maíz genéticamente modificado en el valle Chancay-Lambayeque.**
 - a.1) Detectar la presencia del promotor 35S y el terminador *nos* en muestras de hojas de maíz provenientes de campos de cultivo del valle Chancay-Lambayeque.
 - a.2) Identificar el o los eventos específicos de maíz genéticamente modificado, que sean detectados en el análisis de screening.

ÁREA DE TRABAJO:

3 provincias de la Región Lambayeque.

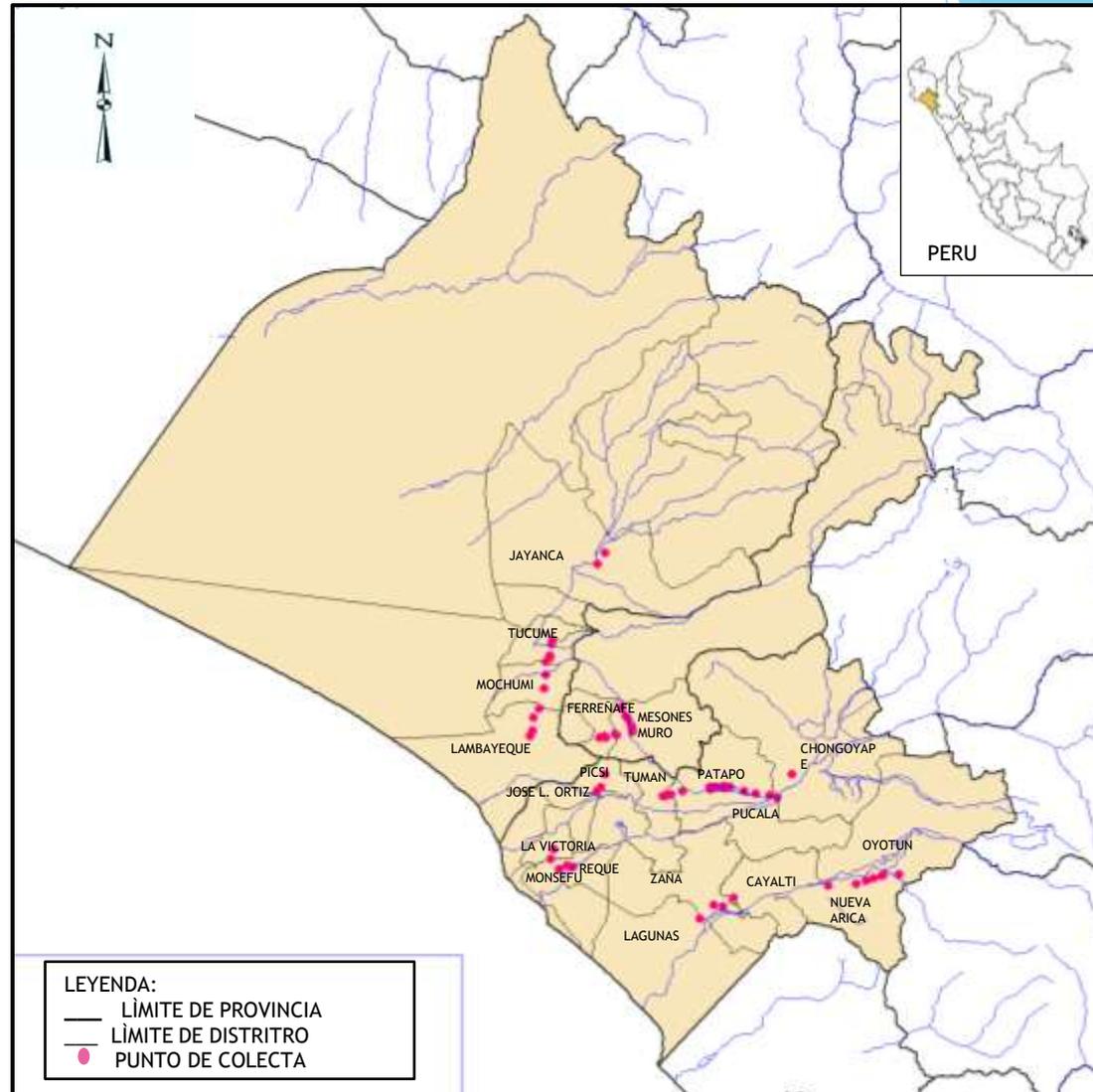
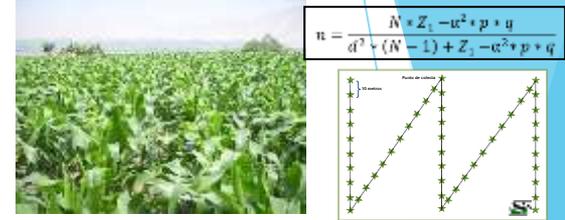


Figura 1. Área de Trabajo: Lugares donde se realizaron las labores de colecta en el valle Chancay-Lambayeque

METODOLOGÍA:

TAMAÑO DE MUESTRA:

- El tamaño de muestra por campo fue conforme a lo estimado en el trabajo realizado en el año 2009 en la localidad de Barranca.
- Se ha recolectado muestras de un total de 75 campos de cultivo de maíz amarillo duro para el análisis en el Laboratorio de Detección de OVM del INIA.



METODOLOGÍA DE COLECTA:

- Se colectaron un promedio 52 hojas (porciones de 10 cm aproximadamente) por campo de cultivo. Cada muestra de hoja pertenecía a una planta (de acuerdo al método publicado por Rimachi y colaboradores, 2011).
- Se seleccionaron aleatoriamente los campos de cultivo.
- Las muestras de cada campo fueron depositadas en 1 bolsa de papel, debidamente rotulada con lápiz, indicando el número de muestra, la zona de colecta, la fecha y el punto GPS. Seguidamente, estas bolsas, fueron depositadas en un recipiente conteniendo geles refrigerantes para su conservación a aproximadamente 4° C, hasta el momento del acondicionamiento en el Laboratorio.



METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS POR PCR

2. Preparación de muestra



2. Preparación de ADN molde



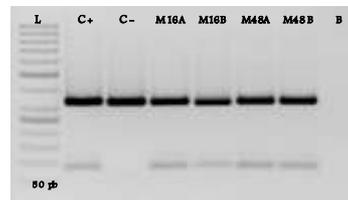
3. PCR



4. Electroforesis y fotodocumentación



5. Análisis de resultados y elaboración de informe de ensayo



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESQUERÍA



Instituto Nacional de Innovación Agraria

METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS POR PCR

1. Preparación de la muestra

- La muestra analítica de cada campo de cultivo fue triturada y homogenizada en un mortero con nitrógeno líquido.
- La porción de ensayo usada es aproximadamente 200 mg del producto triturado



2. Preparación del ADN molde

- El ADN fue extraído empleando el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit, de QIAGEN
- El ADN extraído fue cuantificado con el equipo Nanodrop 2000.
- La calidad del ADN fue visualizada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (muestras seleccionadas aleatoriamente).

Se verificó la calidad de ADN de cada muestra con apoyo del equipo NanoDrop 2000.

- El ADN extraído fue uniformizado a una concentración de 20 ng/ μ L aproximadamente, para su posterior empleo en la amplificación por PCR.



METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS POR PCR:

3. PCR

- Se emplearon 2 réplicas de PCR como mínimo.
- Los materiales de referencia certificados corresponden a las empresas AOCS y ERM.
- El kit para la preparación de la mezcla de PCR fue de la marca KAPA BIOSYSTEMS, los dNTPs fueron de Fermentas.
- Los iniciadores empleados fueron los siguientes:
 - Detección de OVM (screening)
 - Identificación de EE

Tabla 2. Iniciadores utilizados para el análisis PCR de barrido.

TIPO DE INICIADOR	INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	ELEMENTO BLANCO	REFERENCIA
Endógeno	ZEIN01	TGCTTGCATTGTCGCTCTCCTAG	329	Gen zeína	Chiueh et al., 2002; Rahman et al., 2007, GMDD.
	ZEIN02	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT			
Screening	P35SL	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	195	Promotor 35S	Lin et al., 2000, GMDD.
	P35SU	GCTCCTACAAATGCCATCA			
	Tnos F	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTCTG	151	Secuencia de poliadenilación	GMDD; Lee et al., 2004
	Tnos R	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT			

Tabla 3. Iniciadores utilizados para identificación de evento específico (EE).

Blanco	Iniciador	Secuencia del iniciador	Amplificación (pb)	Referencia
Zeína	ZEIN01	TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG	329	Chiueh et al., 2002; Rahman et al., 2007; GMDD.
	ZEIN02	GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT		
T25	MLD143	ACAAGCGTGTGCTGCCAC	102	EURL-GMFF, 2010.
	MDB551	GACATGATACTCTCCACCG		
BT 176	CRY A(B) EVENT 176-F	CGGCCCCGAGTTCACCTT	570	GMDD.
	CRY A(B) EVENT 176-R	CTGCTGGGGATGATGTTGTTG		
TC 1507	QTC1507-1F	GACGTCTCAATGTAATGGTTAACA	83	Yang et al., 2007.
	QTC1507-2R	CCTAGTATATGAAAAGTAAAA GGTGCTT		
MON 810	VW01	TCCAAGGACGAAGGACTCTAACG	170	GMDD.
	VW03	TCCATCTTTGGGACCACTGTGCG		
DAS 59122	59122-1F	ACG ATT CAG ATG GCA AAA CTA TG	285	GMDD, XIANG LI, 2009
	59122-2R	GGT TCT GTC AGT TCC AAA CGT AA		

- La Amplificación fue realizada en un termociclador de la marca Eppendorf, ProS.



METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS POR PCR:

4. Electroforesis y Fotodocumentación:

- Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.8% y visualizados por tinción con Gel Red (1.2 X).
- La fotodocumentación fue realizada en el fotodocumentador Gel Doc TM XR+System, de la marca BIORAD.



5. Análisis de resultados y elaboración de informe de ensayo:

- Se verificó que los controles positivos (MRC) y negativos (maíz INIA y blanco) estén correctos.
- Se registró los resultados de las muestras y controles.
- Se elaboró el informe de ensayo.



RESULTADOS:

- ✓ Se detectó el promotor 35S en dos campos de los 75 campos de cultivo de maíz del Valle Chancay-Lambayeque

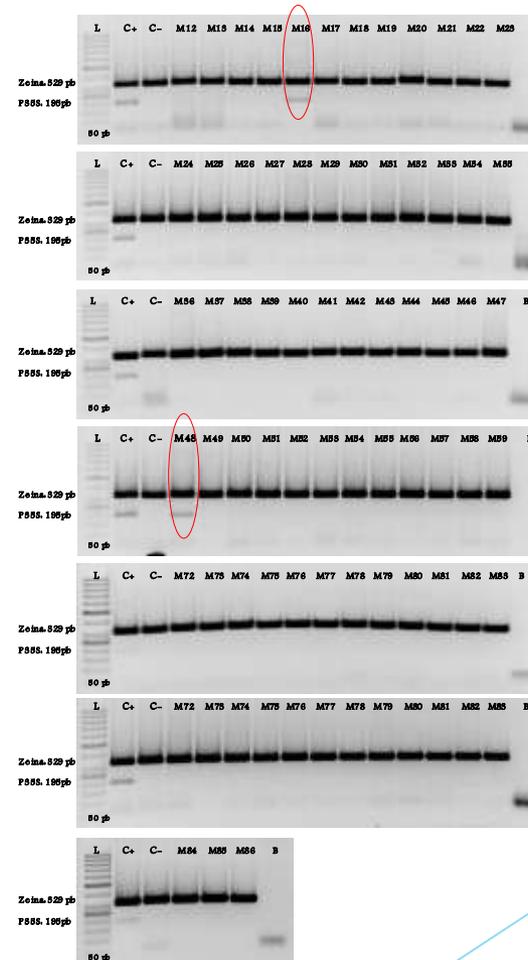


Figura 2: Perfil electroforético del análisis de screening para detección del promotor 35S (195 pb) e identificación del gen *Zeina* (329 pb). L es el ladder 50pb, C+ es control positivo al 1%; C- es control negativo al 100%, y B es el blanco (mezcla para PCR sin ADN).

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCO



Instituto Nacional de Innovación Agraria

RESULTADOS:

- ✓ No se detectó el terminador nos en los 75 campos de cultivo de maíz del Valle Chancay-Lambayeque.

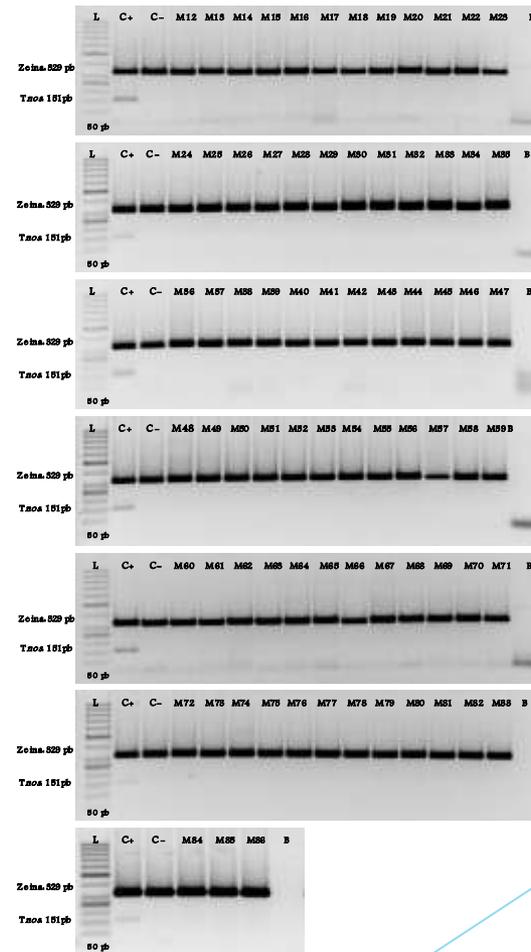


Figura 3: Perfil electroforético del análisis de screening para detección del terminador *nos* (151 pb) e identificación del gen *Zeina* (329 pb). L es el ladder 50pb, C+ es control positivo al 1%, C- es control negativo al 100%, y B es el blanco (mezcla para PCR sin ADN).

RESULTADOS:

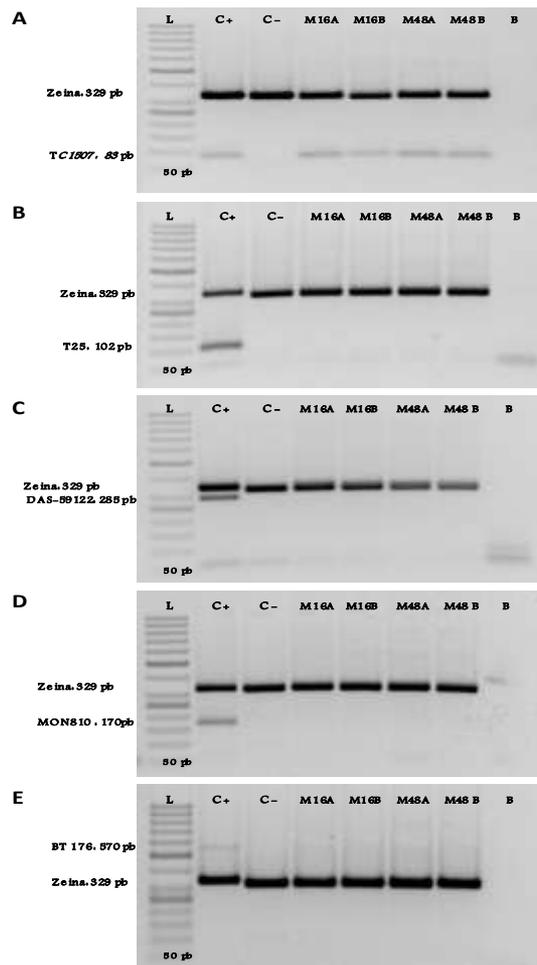


Figura 4: Perfil electroforético del análisis de identificación del gen *Zeina* (329 pb); A: detección del evento TC1507; B: detección del evento DAS-59122-7, D: detección del evento MON810, E: detección del evento BT176. L es el ladder 50pb, C+ es control positivo al 1%, C- es control negativo al 100%, y B es el blanco (mezcla para PCR sin ADN).

✓ Se detectó la presencia del evento TC17025 en dos campos de cultivo de maíz del Valle de Chancay-Lambayeque.

Tabla 4. Resultados del análisis de detección de OVM (screening).

DISTRITO	CAMPOS EVALUADOS	Muestras Positivas T25	Muestras Positivas BT176	Muestras Positivas TC1507	Muestras Positivas MON 810	Muestras Positivas DAS 59122
LAMBAYEQUE	1	0	0	1	0	0
PATAPO	1	0	0	1	0	0
TOTAL	2	2	0	2	0	0

RESULTADOS:

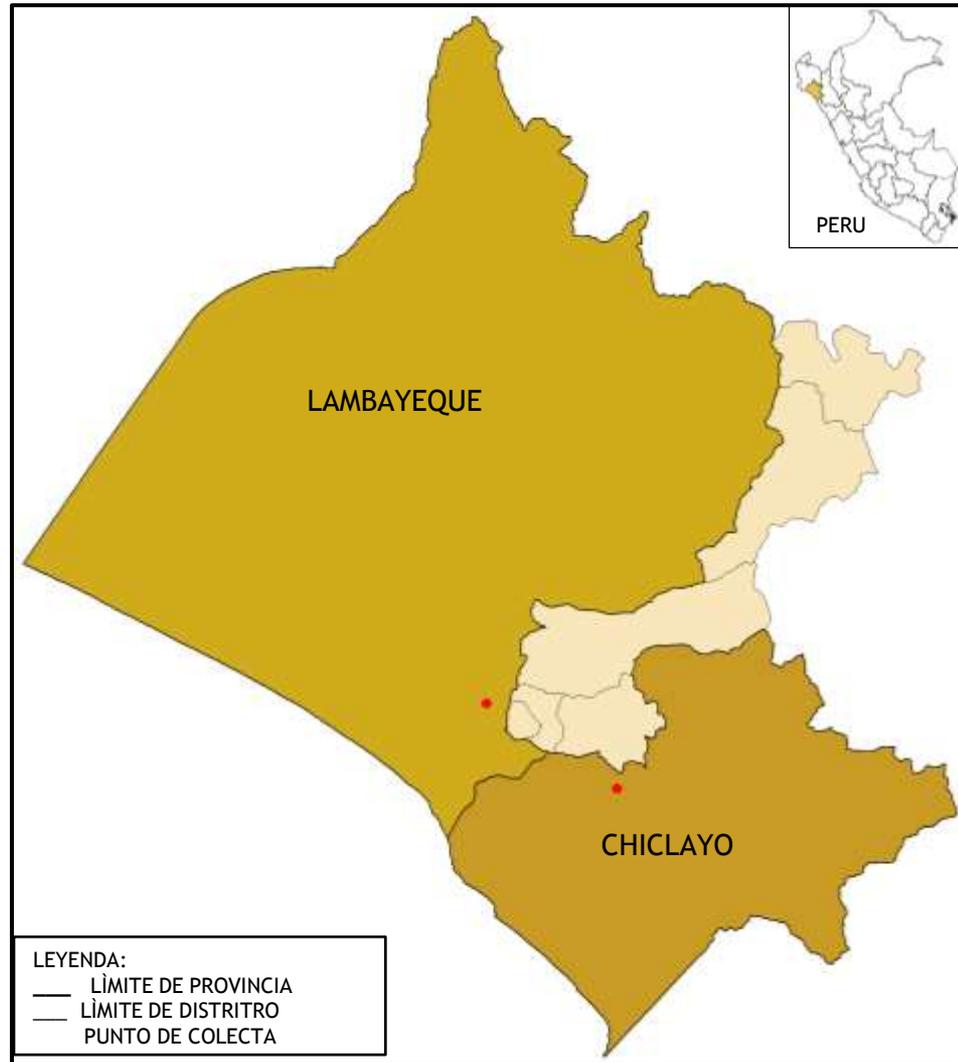


Figura 5. Ubicación geográfica, a nivel de provincia, del punto de colecta de muestras en las que se detectó presencia de maíz genéticamente modificada

RESULTADOS:

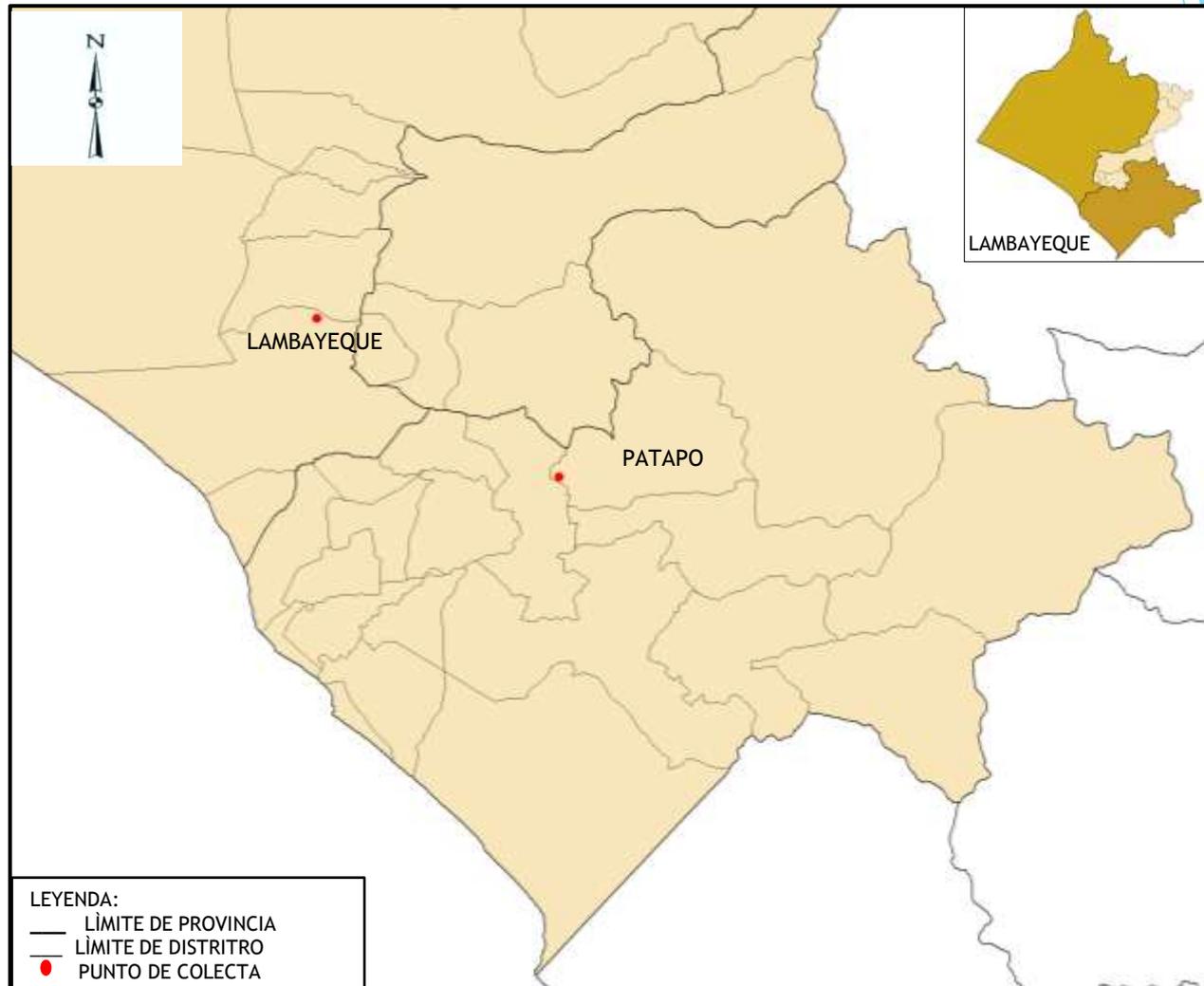


Figura 6. Ubicación geográfica, a nivel de distrito, del punto de colecta de muestras en las que se detectó presencia de maíz genéticamente modificada

CONCLUSIONES:

- ✓ Se ha detectado la presencia de las secuencias de origen transgénico P35S en 2 campos de 75 campos cultivados con maíz amarillo duro del valle Chancay-Lambayeque. Estos campos están localizados los distritos de Lambayeque y Patapo de las provincias Lambayeque y Chiclayo, respectivamente.
- ✓ Se ha detectado e identificado al evento TC 1507 en los 2 campos que mostraron presencia del promotor 35S.



MINISTERIO
DE AGRICULTURA
Y RIEGO

GRACIAS.



Instituto Nacional de Innovación Agraria