

INFORME TÉCNICO

Interpolinización entre cultivos de maíz transgénico y no transgénico comerciales en Uruguay

Pablo Galeano^{1,3,*}, Claudio Martínez Debat², Fabiana Ruibal², Laura Franco Fraguas³,
Guillermo A. Galván¹

¹ Centro Regional Sur, Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Camino Folle km 36, Progreso, Canelones. Uruguay.

² Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

³ Cátedra de Bioquímica, DepBio, Facultad de Química, Universidad de la República.

* E-mail: pgaleano@fq.edu.uy

Resumen

En Uruguay está autorizado el cultivo de maíz transgénico Bt (eventos Mon810 y Bt11). La reglamentación vigente para su cultivo, exige que un 10% del área sembrada se haga con un cultivar no transgénico a modo de refugio de biodiversidad, y que se guarde una distancia de aislamiento de al menos 250 metros desde otros cultivos no transgénicos. Se desconoce el grado de interpolinización entre cultivos de maíz en Uruguay, y por tanto el grado de contaminación con Bt. Este aspecto es de interés para la conservación *in situ* de recursos genéticos locales, para la producción orgánica, y para la producción en Uruguay de semilla de maíz de alta calidad. En este trabajo se evaluó la ocurrencia y frecuencia de fenómenos de interpolinización entre cultivos comerciales de maíces transgénicos y no-transgénicos (GM y no-GM) cercanos, mediante muestreos a campo y detección de los eventos mediante DAS-ELISA y PCR con cebadores específicos. Se identificaron nueve situaciones, en que se encontraron chacras de maíz GM y no-GM vecinas. De estos nueve casos, se identificaron cinco con potencial riesgo de interpolinización en función de la distancia entre los cultivos y la coincidencia en las fechas de siembra. De éstas, tres dieron como resultado presencia del transgen en la progenie del maíz no-GM, determinándose que el transgen encontrado coincide con el del evento presente en la chacra vecina sembrada con maíz GM. Las frecuencias con que se detectaron transgenes en la progenie de los cultivos no-GM, fueron de 1/180, 1/120 y 1/764 para sitios que estaban respectivamente a una distancia de 40, 100 y 330 metros, del cultivo de maíz GM. Esta información aporta elementos concretos que ayudan a evaluar la aplicabilidad de la política de coexistencia regulada.

Introducción

En Uruguay está autorizado el cultivo de maíz transgénico Bt, eventos Mon810 y Bt11, a partir de los años 2003 y 2004 respectivamente. Estos eventos portan un transgen de *Bacillus thuringiensis* que codifica para una proteína (Cry1Ab) tóxica para larvas de lepidópteros que son plagas del maíz. Las resoluciones del Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) 276/2003 y 292/2004 establecen como requerimientos para su cultivo, que un 10% del área sembrada debe realizarse con un cultivar no transgénico a modo de refugio de biodiversidad, y que se debe guardar una distancia de aislamiento de por lo menos 250 metros desde otros cultivos no transgénicos.

En la zafra 2007-2008 se sembraron 80.500 ha de maíz en el Uruguay, participando de la misma 2821 productores (MGAP-DIEA, 2008). El 86% de éstos productores sembraron menos de 20 ha, y representaron un 7% del área total sembrada con maíz. Si bien no hay datos del área total sembrada con maíz transgénico, el volumen de semilla importada es un indicador de su participación en la producción. El 66% del volumen de semilla importada en el 2007 y el 82% en el 2008 correspondieron a este tipo de semilla (INASE, <http://www.inase.org.uy>). Esto indica que en la última zafra (2008-2009) alrededor del 80% del área sembrada con maíz (unas 100.000 has totales), lo fue con maíz Bt.

No existen a la fecha estudios sobre el grado de interpolinización entre cultivos de maíces transgénicos (GM) y no transgénicos (no-GM) en Uruguay, y por tanto se desconoce el eventual grado de contaminación con Bt. Este aspecto es de interés para la conservación *in situ* de recursos genéticos locales, para la producción orgánica, y para la producción en Uruguay de semilla de maíz de alta calidad.

Polinización en maíz

El maíz (*Zea Mays* L.) es una planta monoica que tiene al viento como principal vector de dispersión del polen (anemofilia). Esto hace que exista un alto grado de polinización cruzada entre cultivos cercanos. Varios estudios han demostrado flujo de polen desde variedades de élite hacia variedades locales, entre variedades y entre híbridos (Burris, 2001; Doebley, 1990; Sanou *et al.*, 1997). La interpolinización entre cultivos cercanos es un punto especialmente crítico en el caso del flujo de transgenes desde maíces GM a maíces no-GM.

Varios estudios han intentado caracterizar la dispersión del polen del maíz, generalmente sobre la base de modelos de pequeña escala (Jørgensen & Wilkinson, 2005). La velocidad del viento es la principal variable en la determinación de la cantidad de polen que se dispersará en el aire, ya que impulsa la liberación de los granos de polen desde las anteras. Una vez en el aire, la velocidad con que los granos de polen decantan depende de fuerzas que se contraponen, por un lado la gravedad y por otro las turbulencias y las corrientes de aire convectivas que los mantienen suspendidos incluso por períodos de varias horas (Ramsay, 2005). La combinación de estos factores hace que, la densidad de polen en el aire disminuya a cortas distancias desde su fuente hasta alcanzar valores que se mantienen a distancia más largas. Emberlin *et al.* (1999) estimaron que a 60 m del borde del cultivo la densidad de polen baja a un 2% de la encontrada sobre el cultivo, pero se mantiene en el entorno de 0.5-0.75% a 500 m. Dado que el punto relevante para nuestro estudio es la frecuencia con que se dan cruzamientos exitosos por interpolinización entre cultivos vecinos, la viabilidad del polen es un aspecto central. Generalmente los granos de polen permanecen viables por una o dos horas luego de que se desprenden de la panoja (Luna *et al.* 2001). Sin embargo, dependiendo de condiciones ambientales como la temperatura, la humedad y el potencial hídrico atmosférico, pueden llegar a permanecer viables por más de 24 horas (Ma *et al.* 2004). Brunet *et al.* (2003)

realizaron una serie de experimentos en los cuales colectaron y midieron la viabilidad de granos de polen de maíz en la atmósfera en una capa de 1.8 km de altura. Encontraron concentraciones de entre 0.2 y 1.1 granos/m³ a través de toda esta capa atmosférica. La viabilidad de estos granos varió con la altura, siendo de 40-50% cerca del suelo y de 5-10% por encima de los 1.8 km de altura. Dados los fuertes vientos laterales que se dan a estas altitudes es inevitable, que al menos en muy baja frecuencia, se den eventos de cruzamientos por interpolinización a grandes distancias, aún a cientos de kilómetros (Ramsay, 2005).

Flujo de transgenes en maíz

A partir de la liberación para cultivo de maíces GM, el tema de la dispersión del polen y del cruzamiento entre distintos genotipos de maíz, ha adquirido una mayor relevancia. Se han realizado varios trabajos que miden el flujo de genes por interpolinización, algunos de los cuales han sido recopilados por Devos *et al.* (2005) y más recientemente por Sanvido *et al.* (2008). Muchos de estos trabajos han tenido como objeto aportar información que ayude a definir las distancias de aislamiento necesarias, para que la presencia de transgenes en los cultivos no-GM, se mantenga por debajo de determinados niveles según las exigencias de algunos mercados, particularmente el de la Unión Europea (UE). Los distintos enfoques en la investigación, métodos analíticos y diseños experimentales utilizados, dificulta la comparación de resultados, lo cual complica la definición de medidas apropiadas que limiten en el campo la polinización cruzada (Devos *et al.* 2005). Esto se refleja en el hecho de que distintos países de la UE exigen en sus reglamentaciones nacionales distintas distancias de aislamiento entre maíces GM y no-GM, a pesar de que se rigen por directivas comunes en cuanto al etiquetado de alimentos GM ((EC) N° 1829/2003) y que comparten la misma política de coexistencia. A modo de ejemplos extremos, mientras que en Hungría en 2006 se exigían 800 m, en Holanda se exigían 25 m de aislamiento (Comission of the European Communities, 2006). Luna *et al.* (2001) investigaron la dispersión de polen de maíz a distancias largas en México. Teniendo en cuenta las condiciones ambientales de la región donde desarrollaron su trabajo, determinaron que la distancia máxima lateral teórica que puede recorrer el polen es de 32 km. A partir de una fuente de polen de 4000 m², midieron la presencia de genes marcadores derivados de esta fuente, en parcelas de maíz de 12.8 m² a varias distancias. Detectaron polinización cruzada a 200 m pero no a 300 m. En otro trabajo llevado adelante en el Reino Unido, Weeks *et al.* (2003) detectaron polinización cruzada a 630 m de distancia de la fuente de polen, en ensayos realizados a escala de cultivo. Estos dos trabajos muestran cómo diferentes aproximaciones al estudio del flujo de transgenes pueden arrojar resultados distintos.

Además de factores ambientales como el viento y la humedad, y de factores biológicos como la sincronización en la floración, el flujo de genes entre cultivos de maíces GM y no-GM también se ve afectado por el tamaño y orientación de los cultivos entre los cuales se da la interpolinización. La mayor parte de los experimentos realizados para medir el flujo de genes en maíz, han utilizado una única fuente de polen, cuya escala muchas veces es más pequeña o de tamaño equivalente a la del cultivo receptor (Sanvido *et al.* 2008). Sin embargo, a medida que se extiende el cultivo de maíz GM, un cultivo no-GM puede recibir polen de varias fuentes o de fuentes notoriamente más grandes en superficie (Devos *et al.* 2005). Otro aspecto a considerar, es que muchas investigaciones midieron la variación en el flujo de genes a distintas distancias desde la fuente de polen sobre un cultivo continuo. Es decir, entre la fuente de polen y el maíz receptor muestreado hay cultivo de maíz. Esto arroja frecuencias de interpolinización menores a los casos en que entre el maíz dador y el receptor no hay un cultivo (Weekes *et al.* 2007). Por lo comentado, es necesario medir a nivel de campo, en situaciones de cultivo comercial reales, lo que realmente está ocurriendo con el flujo de

transgenes, sobre todo si se tiene en cuenta que actualmente, el área cultivada con maíz GM en Uruguay es muy superior a la sembrada con maíz no-GM.

Con este estudio, se pretende contribuir al conocimiento sobre el flujo de transgenes desde maíces GM a maíces no-GM en cultivos comerciales en Uruguay. Para esto se realizaron muestreos en cultivos comerciales de maíz GM y no-GM cercanos. En la progenie de estos últimos se analizó la presencia de transgenes utilizando técnicas basadas en la detección de la proteína transgénica (Cry1Ab) y en la presencia del transgen. Generar información acerca de lo que ha sucedido en Uruguay desde la introducción de maíz GM, en términos de si ha habido o no contaminación de cultivos de maíz no-GM, aporta elementos concretos que permiten evaluar la aplicabilidad de la política de coexistencia regulada consagrada en el Decreto 353/008 que rige sobre los vegetales genéticamente modificados.

Materiales y Métodos

Muestreos y producción de plantines

En la zafra 2007/2008, luego de visitar más de 40 establecimientos en los departamentos de Colonia y San José, se encontraron nueve situaciones en las que había cultivos de maíz GM y no-GM cercanos. Tomando en cuenta, además de la distancia, la coincidencia en las fechas de siembra (menor a dos semanas), cinco de estas situaciones presentaban potencial riesgo de interpolinización. Se tomaron muestras y analizaron las nueve situaciones. La distancia entre cultivos y sus coordenadas geográficas se determinaron utilizando tecnología GPS y los datos fueron analizados utilizando el programa Google Earth. En la tabla 1 se presentan los datos para los cinco casos con potencial riesgo de contaminación.

Tabla 1.

Datos de los cultivos muestreados que presentaban potencial riesgo de contaminación.

Caso	Cultivo no-GM			Distancia(m)/ orientación	Cultivo GM		Dif. días Siembra
	Cultivar	Área (has)	Sitio		Evento	Área (has)	
1	IPB 871 CL	9,0	1.1	40 S	Mon810 + Bt11	60,0	0
			1.2	190 S			
2	IPB 871 CL	9,5	2.1	380 NE	Mon810	40,0	-2
			2.2	180 E			
			2.3	100 E			
3	IPB 871 CL	0,8	3.1	20 N	Mon810	20,0	-3
4	Línea básica	4,5	4.1	330 N	Bt11	30,0	+1
5	No-GM	3,5	5.1	30 SW	GM	0,6	+14

En el caso 1 se muestrearon dos sitios dentro de la misma chacra de maíz no-GM a distintas distancias del cultivo GM vecino. En el caso 2 se muestrearon 3 sitios.

En el caso 5 no se obtuvo el dato de los cultivares utilizados en las chacras.

Además de la distancia se indica la orientación en que se encontraba el cultivo GM respecto del no-GM.

En la última columna se indica la diferencia en los días de siembra del cultivo GM respecto del no-GM.

Para cada sitio estudiado se procedió de la siguiente forma: en la primer visita a la chacra se tomaron muestras de hojas de las plantas madres a fin de confirmar que las mismas fueran de un cultivar no-GM en un caso, y GM en el cultivo cercano. Las muestras se tomaron por grupos de 15 plantas, tomando como mínimo dos grupos por sitio. En el caso de las chacras con cultivos no-GM se volvió a tomar muestras cuando el cultivo alcanzó un grado de desarrollo tal que presentaba granos maduros en las espigas. En este caso, se tomó una espiga por planta de grupos de 15 plantas escogidas al azar dentro de sitios definidos por la distancia al cultivo transgénico. En el caso de uno de los predios no-GM con potencial riesgo de contaminación, se realizó un muestreo al azar del grano ya cosechado.

Las muestras de hojas se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento y análisis. En el caso de las espigas, se tomaron 30 granos de cada una. Luego se sembraron 4 granos por espiga para la producción de plantines. Estos plantines se usaron para el análisis de ADN por PCR y la determinación de proteína Cry1Ab/1Ac por DAS-ELISA. Para el análisis de plantas madres se tomaron en total, muestras de hojas de 645 plantas organizadas en 43 grupos de 15, de chala de 30 plantas y de raíces de 2 plantas. Para el análisis de la progenie se muestreó un total de 384 espigas provenientes de igual número de plantas organizadas en 23 grupos de 15, más 7 grupos con un número variable de espigas. A partir de estas espigas se tomaron 11520 granos y se produjeron 1536 plantines. En el caso en que se muestrearon granos ya cosechados, se produjeron 764 plantines.

Detección del transgen

Sobre muestras compuestas de 30 hojas provenientes de plantas madres o de plantines, se realizó extracción de proteínas solubles o de ADN según el método de detección empleado fuese DAS-ELISA o PCR. Todas las muestras se analizaron por DAS-ELISA, analizándose por PCR las muestras que dieron positivas por el primer método a fin de confirmar transgenicidad e identificar el evento. Algunas muestras negativas por DAS-ELISA, también se analizaron por PCR con el propósito de confirmar resultados.

DAS-ELISA

Para las determinaciones por DAS-ELISA se utilizó PathoScreen kit for Bt-Cry1Ab/1Ac protein de la empresa Agdia (PSP 06200, Agdia Inc, Indiana, USA) procediéndose según las instrucciones del fabricante. Los extractos acuosos de proteínas solubles, fueron preparados a partir de tejido vegetal en buffer PBS-T pH 7.4. Se agregó 100 μL de cada extracto en un pocillo cubierto del anticuerpo específico para Cry1Ab/1Ac en las placas de DAS-ELISA, junto con 100 μL del conjugado enzimático y la mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se hicieron lavados de las placas, se agregó TMB como sustrato y la presencia de la proteína se detectó por cambio de coloración en la solución utilizando un equipo lector de placas de ELISA. Todos los ensayos se hicieron por duplicado y se utilizó el control positivo del kit y un control negativo comercial (Agdia Inc, Indiana, USA).

Extracción de ADN

La extracción de ADN de maíz se realizó por duplicado usando una modificación del método descrito por Dellaporta (1983) a partir de 100 mg de hojas (previamente disgregadas bajo N_2 líquido en mortero). Se resuspendió el ADN en 100 μL de agua destilada de calidad MilliQ y se estimó su concentración mediante espectrofotometría UV. La muestra se diluyó a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, y se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis mediante técnicas de PCR.

Reacción en cadena de la Polimerasa(PCR).

La estrategia implicó un test inicial de transgenicidad, usando cebadores para el promotor CaMV 35S, y luego para los casos positivos, la identificación de eventos utilizando VW01 / VW03 (para Mon810) y PatB / IVS2-2 (para Bt11). Todas las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR de 250 μL conteniendo buffer de PCR (Fermentas) 1X, 0.2mmol L^{-1} de los desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs), 2mmol L^{-1} MgCl_2 , 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de los cebadores, 1 U Taq de la ADN polimerasa (Fermentas) y 1 μL (100 ng) de ADN. Las PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, con el siguiente programa: un primer paso de desnaturalizaron durante 3min a 94°C seguidos de 35 ciclos de desnaturalización (45s a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$), 55s a la temperatura de alineamiento correspondiente y 45s a 72°C , seguido de un paso final de extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 min. Las reacciones de PCR

(25 uL volumen final) incluyeron siempre un control positivo y un control negativo y fueron realizadas en al menos tres experimentos independientes. Típicamente, 5-6 uL de cada tubo de reacción fueron analizados posteriormente, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (6%) y posterior tinción con AgNO_3 (Sanguinetti et al., 1994).

Análisis de datos

La detección de transgenes en la progenie de los cultivos no-GM, se basó en la técnica de DAS-ELISA. Además, se utilizó el análisis por PCR para confirmar transgenicidad e identificar el evento involucrado. El análisis de plantines se hizo utilizando muestras compuestas con tejido de hojas de 30 individuos. Como mínimo, se analizaron cuatro de estas muestras por sitio. Las muestras que dieron positivas se abrieron a su vez en tres submuestras de 10 individuos, a fin de confirmar la posibilidad de que hubiera más de un individuo positivo por muestra.

La frecuencia con que se detectó la presencia de transgenes en la progenie de los cultivos no-GM se expresó según dos criterios:

- i) como número de individuos que expresan el transgen (la proteína Cry1Ab) sobre el total de individuos analizados para cada sitio.
- ii) como la frecuencia (p) para la cual, dado el tamaño de la muestra para cada sitio, la probabilidad de detección (P_d) es de 95%.

Se define la P_d como la probabilidad de detectar al menos un individuo positivo en una población de n individuos, según la fórmula:

$$P_d = 1 - (1 - p)^S$$

donde S es el número de individuos analizados (n) por sitio, asumiendo que los individuos positivos están distribuidos con una frecuencia uniforme p (Piñeyro-Nelson *et al.* 2008). Se considera a S como n dado que se asume que las plantas madres no portan el transgen. Para una muestra de n individuos, hay una P_d del 95% para una $p = 1 - \sqrt[n]{0.05}$. En los casos en que no se detectó ningún positivo, se puede afirmar con un 95% de confianza que la frecuencia de interpolinización con el transgen es $p < 1 - \sqrt[n]{0.05}$.

Resultados y Discusión

El análisis de las plantas madres tanto por DAS-ELISA como por PCR, en todos los casos confirmó la información aportada por productores y técnicos a nivel predial en cuanto a si el cultivo de maíz era o no GM. Esto permite inferir que en los casos en que se detectó transgenes en la progenie de cultivos no-GM, los mismos se adquirieron por interpolinización con un cultivo de maíz GM.

De las nueve situaciones en las que había cultivos de maíz GM y no-GM cercanos, sólo cinco presentaban riesgo real de interpolinización con cultivos de maíz GM, teniendo en cuenta la distancia y la coincidencia en las fechas de siembra de ambos cultivos (Tabla 1). En tres de estas situaciones (Casos 1, 2 y 4 en la Tabla 1) se detectó presencia de transgenes en la progenie del cultivo de maíz no-GM. En todos los casos, el transgen detectado correspondió al del evento que estaba presente en el cultivo GM vecino (Tabla 2). El análisis de los cuatro casos en que no había riesgo de contaminación dio como resultado ausencia de transgenes en la progenie de los cultivos no-GM.

La Figura 1 muestra, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en una placa de DAS-ELISA. Las muestras se sembraron por duplicado en dos pocillos contiguos. En las columnas

pares se detuvo la reacción utilizando H₂SO₄ 3M lo que provoca que el color vire del azul al amarillo. Por tanto, dos pocillos contiguos (uno azul y otro amarillo), indican presencia de la proteína transgénica Cry1Ab en la muestra.

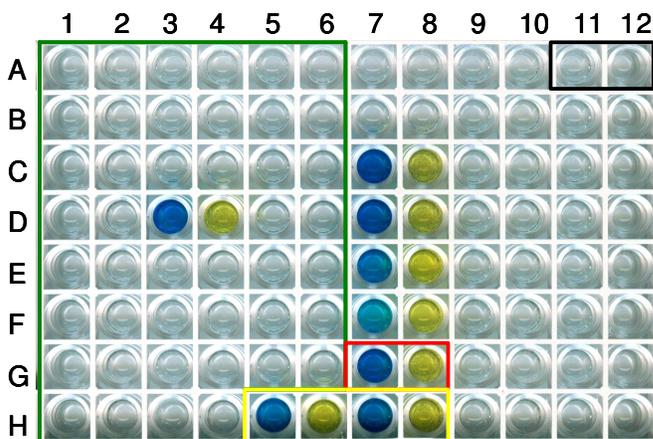


Figura 1. Placa para detección de la proteína Cry1Ab/1Ac por DAS-ELISA. Cada muestra ocupa dos pocillos en columnas contiguas (por ej. A1 y A2 contienen la misma muestra). Un pocillo azul con un pocillo amarillo contiguo indican presencia de la proteína transgénica. Enmarcados en verde se indican pocillos de 23 muestras compuestas de plantines de la progenie de la chacra no-GM del caso 4. Se observa en D3 y D4 detección de la proteína Cry1Ab/1Ac en una de las muestras. Enmarcados en amarillo hay 4 pocillos correspondientes a dos muestras de plantas madres del maíz GM vecino. En negro y rojo se indican respectivamente los controles negativo y positivo provistos por la empresa Agdia.

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la detección de transgenes en la progenie de los cultivos no-GM, para los casos con potencial riesgo de interpolinización. Como se describió en Materiales y Métodos, el análisis de plantines se hizo utilizando muestras compuestas con tejido de hojas de 30 individuos (por ejemplo, 6 muestras para el sitio 1.1 y 4 muestras para 1.2). Las muestras que dieron positivas (una en el sitio 1.1, una en 2.3 y una en 4.1) se abrieron a su vez en tres sub-muestras de 10 individuos. En todos los casos una sola de estas sub-muestras dio positiva por lo que hay una probabilidad mayor al 99% de que sólo un individuo por muestra sea positivo. Dado que la detección de transgenes se basó en la técnica de DAS-ELISA, utilizándose PCR para confirmar transgenicidad (35S) e identificar el evento involucrado (Mon810 o Bt11), los valores de frecuencias se calcularon en base a los datos obtenidos por DAS-ELISA.

Tabla 2.

Análisis de la progenie de las cinco chacras no-GM con riesgo de polinización cruzada.

Caso	Sitio	DAS-ELISA		PCR***			Cultivo GM cercano	
		Nº+s/total*	p**	35S	Mon810	Bt11	Distancia (m)	Evento
1	1.1	1/180	1/60	+	-	+	40	Mon810 + Bt11
	1.2	0/120	< 1/40	-			190	
2	2.1	0/120	< 1/40	-			380	Mon810
	2.2	0/120	< 1/40	-			180	
	2.3	1/120	1/40	+	+	-	100	
3	3.1	0/180	< 1/60	-			20	Mon810
4	4.1	1/764	1/255	+	-	+	330	Bt11
5	5.1	0/180	< 1/60	-			30	GM

* Frecuencia expresada como el número de individuos que expresan el transgen sobre el total de individuos analizados para cada sitio.

** Frecuencia expresada como p con Pd del 95% (ver Materiales y Métodos).

*** Presencia del transgen detectada por PCR. 35S, marcador de transgenicidad; Mon810 y Bt11, marcadores específicos de eventos. + indica presencia de la secuencia marcadora.

En los sitios en que no se tuvo ningún positivo por DAS-ELISA, el test de transgenicidad (35S) se hizo para algunas muestras, no para todas.

Cabe aclarar que lo que se mide es la frecuencia con que se detectó la expresión del transgen y no la frecuencia de interpolinización. En realidad la frecuencia de interpolinización es mayor dado que el maíz híbrido GM, del cual provino el polen parental, es hemicigoto para el transgen (Devos *et al.* 2005) por lo cual sólo la mitad de los granos de polen producidos en el

cultivo GM portan el transgen. Además debe tenerse en cuenta que la detección por DAS-ELISA implica que el transgen, para ser detectado, debe estar funcional para poder expresar la proteína Cry1Ab. Si durante la producción del gameto masculino, en el maíz parental GM, se producen granos de polen que como consecuencia de la recombinación contienen partes del transgen que no expresan la proteína Cry1Ab completa en su descendencia, no serán detectados por DAS-ELISA. Por PCR sí se puede detectar la presencia de transgenes truncados siempre que se conserven las secuencias de ADN reconocidas por los cebadores utilizados. De hecho, en nuestro estudio se analizaron muestras que dieron negativas por DAS-ELISA pero positivas por PCR. En los sitios 1.1 y 2.3, muestras en las que no se detectó la proteína Cry1Ab, sí se identificó por PCR la presencia del promotor CaMV35S. Además, se determinó que el transgen presente correspondía al evento Bt11 en el primer caso y Mon810 en el segundo. De todas formas estos datos no se tuvieron en cuenta a la hora de calcular las frecuencias.



Figura 2. Esquema sobre foto satelital del Caso 1.

En celeste se recuadra la chacra de maíz no-GM. En blanco se indican los sitios muestreados. En rojo se recuadra la chacra de maíz GM. Esta chacra estaba sembrada con un maíz híbrido Mon810, en su borde Norte tenía ensayos con híbridos que portaban Bt11 o Mon810. La barra blanca indica 100 m.

En el **caso 1** (Figura 2) se detectó presencia de la proteína transgénica en la progenie del cultivo no-GM en el sitio 1.1. Este sitio correspondió al borde de una chacra de maíz no-GM de 9 ha que se encontraba a 40 m de una chacra de maíz GM de más de 60 ha sembrada en la misma fecha. En este sitio, se colectaron 45 choclos de igual número de plantas, a partir de los cuales se produjeron 180 plantines. Hojas de estos plantines se analizaron en seis muestras compuestas de 30 hojas provenientes de igual número de plantines. Una de estas muestras dio positiva por DAS-ELISA (Tabla 2). Para confirmar que no hubiese más de un positivo, la muestra fue subdividida en tres sub-muestras de 10 plantines, dando positivo sólo una de ellas. Esto permite afirmar con una confianza mayor al 99,5% que sólo uno de los 180 individuos analizados expresó el transgen. La transgenicidad de la muestra que dio positiva por DAS-ELISA fue confirmada por PCR. Se determinó que el transgen correspondió al evento Bt11. La chacra con maíz GM vecina tenía sembrado sobre el borde que daba a la chacra de maíz no-GM, un ensayo con distintos híbridos de maíz GM, algunos de los cuales portaban el evento Bt11, y otros el evento Mon810. La frecuencia de individuos que expresaron el transgen en la progenie del sitio 1.1 fue estimada en 1/60 para una Pd del 95%, en base al tamaño de la muestra analizada (Tabla 2). En el sitio 1.2 de la misma chacra, pero

a 190 m de la chacra con maíz GM no se detectó presencia de transgenes. Este resultado es consistente con los obtenidos por otros autores, dado que las frecuencias de interpolinización son usualmente más altas en los bordes de la chacra receptora y decaen rápidamente debido a un aumento en la competencia provocada por el polen producido por este cultivo (Devos et al. 2005).

El **caso 2** (Figura 3) correspondió a una chacra de maíz no-GM de 9.5 ha. En dirección NE a esta chacra, había un cultivo de unas 40 has de maíz GM portando el evento Mon810 sembrado dos días antes. Entre ambos cultivos había una cortina de eucaliptos de unos 30 m de ancho. Al sur, a menos de 20 m había otra chacra de maíz GM pero cuya siembra fue más tardía. Se muestrearon tres sitios de la chacra no-GM (Figura 3, Tabla 2). Se detectó la presencia de transgenes en el sitio 2.3, el más próximo (100 m) a la chacra con maíz Mon810 situada al NE. Para este sitio se analizaron 120 individuos de la progenie. En la muestra en la cual se detectó la proteína Cry1Ab, se confirmó transgenicidad por PCR y se determinó que el transgen que portaba correspondió al evento Mon810. La frecuencia de individuos que expresaron el transgen en la progenie del sitio 2.3, fue estimada en 1/40 para una Pd del 95%. Al igual que para el Caso 1, en los sitios más alejados de la chacra con maíz GM no se detectó presencia de transgenes. Es interesante observar que, a pesar de la presencia de una barrera de eucaliptos, hubo interpolinización.



Figura 3. Esquema sobre foto satelital del Caso 2..

En celeste se recuadra la chacra de maíz no-GM. En blanco se indican los sitios muestreados. En rojo se recuadran las chacras de maíz GM. Al Noreste de la chacra de maíz no-GM hay una chacra de maíz Mon810. Se observa entre ambas una cortina de eucaliptos. La chacra que está más al Sur fue sembrada con maíz GM pero más tarde que las otras dos. La barra blanca indica 100 m.

En el **caso 4** (Figura 4) se detectó polinización cruzada entre una chacra dedicada a la producción de semilla básica de una línea de maíz no-GM de unas 4.5 ha y otra chacra con maíz GM portando el evento Bt11. A 330 m al Norte de la chacra de maíz no-GM, había una chacra de 2.5 ha de maíz Bt11 y 550 m al Noreste había otra chacra de 28 ha con el mismo maíz Bt11. Las siembras del maíz no-GM y del maíz GM se hicieron con un día de diferencia. En este caso, en lugar de muestrear diferentes sitios dentro de la chacra con maíz no-GM, se muestreo a partir de la semilla cosechada del cultivo. El tamaño de la muestra fue más grande dado que la misma es equivalente a haber tomado muestras al azar en toda la chacra. De 764 plantines analizados, producidos a partir de la semilla muestreada, se obtuvo un positivo por DAS-ELISA que fue confirmado por PCR. Por este método se determinó que el transgen que portaba esta muestra corresponde al evento Bt11. La frecuencia de individuos que expresaron el transgen fue estimada en 1/255 para una Pd del 95%.

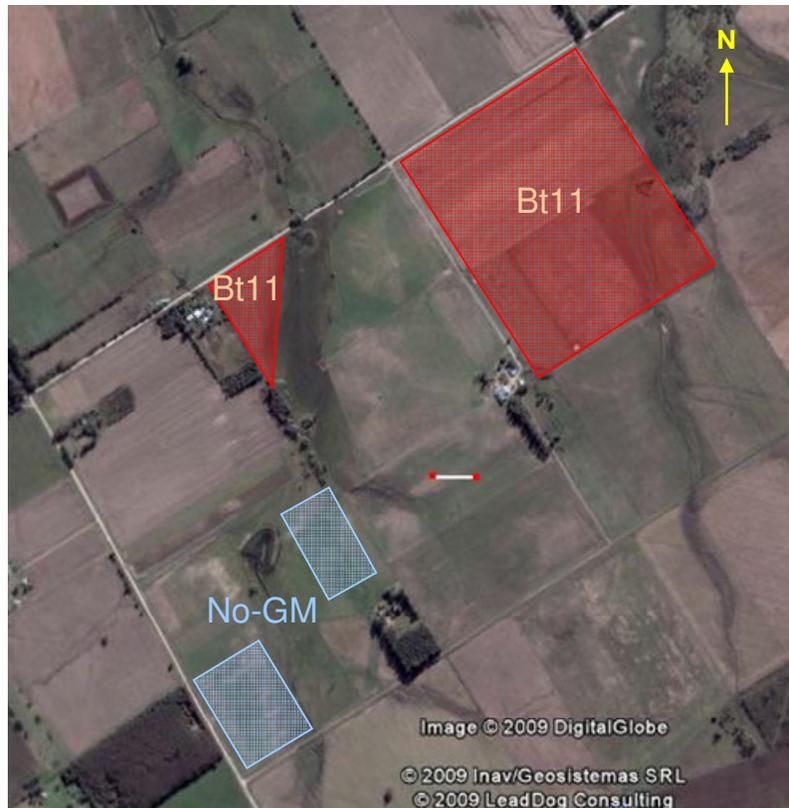


Figura 4. Esquema sobre foto satelital del Caso 4.

En celeste se destacan las chacras de maíz no-GM. En este caso no se muestreo por sitios, sino sobre el grano cosechado de ambas chacras no-GM. En rojo se recuadran las chacras de maíz GM (Bt11). La distancia menor entre las chacras no-GM y GM, fue de 330m. La barra blanca indica 100 m.

En los **casos 3 y 5** no se detectó interpolinización. En el primero de estos casos, si bien había coincidencia en la fecha de siembra, el desarrollo del híbrido transgénico fue notoriamente mayor al del maíz no-GM. En el caso 5 la superficie del área sembrada con maíz GM era unas seis veces menor a la del cultivo de maíz no-GM vecino, además de tener dos semanas de diferencia en la fecha de siembra. La no detección de interpolinización puede deberse a que efectivamente no la hubo debido a la no sincronización en las floraciones, o a que las frecuencias de interpolinización con el transgen fueron más bajas que las que se pueden detectar con el tamaño de muestreo utilizado.

Conclusiones

En Uruguay existe flujo de transgenes desde cultivos comerciales de maíz GM hacia cultivos de maíz no-GM. De cinco casos con potencial riesgo de polinización cruzada, en tres se detectó la presencia del transgen en la progenie del cultivo no-GM. En esos tres casos, el evento encontrado coincidió con el presente en el cultivo de maíz GM cercano, presunto origen de la contaminación.

El establecimiento de una distancia mayor a la reglamentaria de 250 m, en uno de los casos analizados, no evitó que existiera interpolinización. En ese caso, el cultivo de maíz no-GM estaba a una distancia mayor a 330 m del cultivo de maíz GM.

En cuatro de los cinco casos con potencial riesgo de contaminación, la distancia entre los cultivos de maíz no-GM y GM fue menor a la reglamentaria de 250 m. Se detectó interpolinización en dos de estos cuatro casos. En uno de estos casos, en el cual la distancia entre los cultivos fue de 100 m, la presencia de una barrera de 30 m de ancho de eucaliptos no evitó la interpolinización.

En los casos en que se muestreó más de un sitio dentro de una misma chacra de maíz no-GM, se observó que la interpolinización se da con mayor frecuencia en los bordes más cercanos al cultivo de maíz GM vecino.

Este estudio constituye una primera aproximación al conocimiento de la situación real a nivel de campo en Uruguay acerca del flujo de transgenes en maíz. El muestreo y el número de análisis realizados estuvieron acotados por la disponibilidad de recursos con que se contó para su ejecución. Es recomendable para próximos trabajos ampliar la zona de muestreo y analizar para cada caso un mayor número de individuos, a fin de aumentar la precisión de las estimaciones que se realizaron y la probabilidad de detección de frecuencias más bajas de contaminación. El hecho de que tres de cinco casos con potencial riesgo de interpolinización dieron como resultado la presencia de transgenes en la progenie no-GM, indica que este tipo de contaminación no es casual sino común cuando las fechas de floración coinciden y hay vecindad de cultivos de maíz GM y no-GM, aún a distancias mayores a la reglamentaria. Teniendo en cuenta que en las últimas zafras el área sembrada con maíz GM ha ido en aumento, se hace necesario monitorear el flujo de transgenes hacia maíces no-GM de forma de poder evaluar la aplicabilidad de la política de coexistencia regulada.

Referencias

- Brunet Y, Foueillassar X, Audran A, Garrigou D, Dayau S, Tardieu L, 2003.** Evidence for longrange transport of viable maize pollen grains. In: *Proceedings of the 1st European Conference on the Co-existence of Genetically Modified Crops with Conventional and Organic Crops* (ed. B. Boelt), pp. 74–76. Danish Institute of Agricultural Sciences, Slagelse, Denmark.
- Burris JS, 2001.** Adventitious pollen intrusion into hybrid maize seed production fields. Proc. 56th Annual Corn and Sorghum Research Conference 2001. American Seed Trade Association, Inc., Washington, DC
- Comission of the European Communities, 2006.** *Annex to the COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN PARLIAMENT.* Report on the implementation of national measures on the coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming. {COM(2006) 104}. Brussels, 9.3.2006. SEC(2006) 313
- Devos Y, Reheul D, DE SCHRIJVER A, 2005.** The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. *Environ. Biosafety Res.* 4:71–87.
- Doebley J, 1990.** Molecular evidence for gene flow among zea species-genes transformed into maize through genetic-engineering would be transferred to its wild relatives, the teosintes. *Bioscience* 40:443–448.
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J, 1983.** A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19–21.
- Emberlin J, Adams-Groom B, Tidmarsh J, 1999.** A Report on the Dispersal of Maize Pollen. National Pollen Research Unit, University College, Worcester. Report commissioned by and available from the Soil Association, Bristol House, pp. 40–56, Victoria Street, Bristol, BS1 6BY.
- Goss JA, 1968.** Development, physiology and biochemistry of corn and wheat pollen. *Bot. Rev.* 34:333–358.
- INASE, 2009.** Página web institucional, <http://www.inase.org.uy>
- Jørgensen RB, Wilkinson MJ, 2005.** Rare hybrids and methods for their detection. En: Poppy GM, Wilkinson MJ (Eds.), *Gene flow from GM plants*, Blackwell, Oxford, pp. 113-142.
- Luna S, Figueroa J, Baltazar B, Gomez R, Townsend R, Schoper JB, 2001** Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Sci.* 41:1551–1557.
- Ma BL, Subedi KD, Reid LM, 2004.** Extent of Cross-Fertilization in Maize by Pollen from Neighboring Transgenic Hybrids. *Crop Sci.* 44:1273–1282.
- MGAP-DIEA, 2008.** Encuesta Agrícola 'Invierno 2008'
- Piñeyro-Nelson A, van Heerwaarden J, Perales HR, Serratos- Hernández JA, Rangel A, et al. 2009.** Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Mol Ecol* 18:750–761.

- Ramsay G, 2005.** Pollen dispersal vectored by wind or insects. En: Poppy GM, Wilkinson MJ (Eds.), Gene flow from GM plants, Blackwell, Oxford, pp. 43-77.
- Sanguinetti C, Dias Neto E, Simpson A, 1994.** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17(5): 914-21.
- Sanou J, Gouesnard B, Charrier A, 1997.** Isozymes variability in West African maize cultivars (*Zea mays* L.). *Maydica*, 42, 1–11.
- Sanvido O, Widmer F, Winzeler M, Streit B, Szerencsits E, Bigler F, 2008.** Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Res* 17:317–335
- Weekes R, Allnutt T, Boffey C, Morgan S, Bilton M, Daniels R, Henry C, 2007.** A study of crop-to-crop gene flow using farm scale sites of fodder maize (*Zea mays* L.) in the UK. *Transgenic Res* 16:203–211
- Weekes R, Henry C, Morgan D, Boffey C, Daniels R, 2003.** Crop-to-crop gene flow in maize: a challenge to co-existence in England? In: *Proceedings of the 1st European Conference on the Co-existence of Genetically Modified Crops with Conventional and Organic Crops* (ed. B. Boelt), pp. 79–81. Danish Institute of Agricultural Sciences, Slagelse, Denmark.