

Presencia de **transgenes** en maíces criollos.

Resultados 2018 - 2019

Informe Técnico





:: Resumen

El acervo de maíces criollos con que cuenta Uruguay es relevante y es base de una diversidad genética y cultural de gran valor para el país. La presencia de transgenes en los mismos afecta su identidad y pone en riesgo su conservación por parte de los productores. Esto, sumado a procesos como la disminución en el número de productores familiares y cambios en las modalidades productivas, atenta contra los esfuerzos por conservar la diversidad del germoplasma nacional. En el año 2003 se autorizó el cultivo comercial del primer evento transgénico en maíz en Uruguay; a diciembre de 2019 eran trece los eventos aprobados. A pesar de que la reglamentación vigente establece que la política a seguir con relación a la bioseguridad de los cultivos genéticamente modificados (GM) es la 'coexistencia regulada' con otras modalidades productivas, no existen actualmente medidas por parte de la autoridad competente que den garantías al respecto. Desde 2013 hemos evaluado la presencia de transgenes en maíces de productores de la Red de Semillas Nativas y Criollas encontrando casos positivos todos los años a excepción del 2015. Esta Red que articula a productores/as familiares de todo el país, se propone rescatar y revalorizar el uso de semillas criollas. Durante 2018 y 2019 se analizaron 27 muestras colectadas por productores/as y técnicos/as de la Red detectándose la presencia de transgenes en 8 de éstas. Se estimó la frecuencia de individuos transgénicos en dos de estas muestras encontrándose valores de 0.7% y 0.6%. Los métodos utilizados para obtener estos resultados fueron la detección de proteínas transgénicas por DAS-ELISA y la identificación de transgenes por PCR en tiempo real. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Química en colaboración con el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de Facultad de Ciencias. Junto al Departamento de Biología Vegetal de Facultad de Agronomía se elaboró un proto-

colo de muestreo siguiendo estándares internacionales (normas ISTA) con el objetivo de que las muestras colectadas sean lo más representativas posibles de las poblaciones de maíz analizadas. Los resultados obtenidos muestran que en Uruguay persiste la contaminación de variedades criollas de maíz con transgenes, y que es necesario instrumentar medidas para salvaguardar la diversidad del germoplasma nacional.

Introducción

Uruguay cuenta con un valioso acervo genético en maíz originado a partir de la introducción realizada por diversas corrientes inmigratorias, y la subsecuente multiplicación, conservación y selección que han realizado los/as productores/as en los predios durante décadas (Berreta et al. 2007). A partir de una colecta realizada en 1978, los maíces criollos uruguayos fueron clasificados en diez grupos raciales (De María et al. 1979). Esta diversidad de variedades locales tiene un importante valor como fuente de variabilidad para el mejoramiento convencional dada su adaptación a las condiciones agroecológicas locales, y características agronómicas favorables. Además, tiene un valor intrínseco como elemento cultural identitario de los agricultores. La pérdida de diversidad genética en las especies cultivables ha sido ampliamente documentada (Harlan 1972, Brown 1975, Van de Wouw et al. 2010). La sustitución de las variedades locales por cultivares modernos, la especialización productiva y la pérdida de agricultores familiares que son quienes utilizan, conservan y generan los recursos fitogenéticos locales, son las principales causas de esta pérdida.

Como respuesta, en las últimas décadas se han realizado una serie de colectas con el propósito de conservar estos recursos ex situ. Sin embargo, la documentación sobre el estado de conservación de las colecciones ex situ es incompleta o insuficiente, y se desconoce el nivel de representatividad de estas colecciones (Berretta et al. 2007).

Además, la estrategia de conservación *ex situ* no permite que los recursos fitogenéticos sigan evolucionando y diversificándose en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y culturales. Por esto, la Convención de la Diversidad Biológica de 1992 (CDB) reconoce el rol crucial de la conservación *in situ*-on farm (Maxted et al. 1997). Una de las formas más eficientes de apoyar la conservación *in situ* que realizan los productores/as en sus predios, es promover el uso del germoplasma que estos conservan (Clement et al. 2007).

En nuestro país, la Red Nacional de Semillas Nativas y Criollas promueve la conservación *in situ* de germoplasma local en manos de productores/as familiares. Sus objetivos son el rescate, revalorización y mantenimiento de los recursos fitogenéticos locales, así como promover la disponibilidad de semillas criollas de calidad. Está conformada por 160 emprendimientos familiares que involucran a más de 250 productores/as distribuidos en todo el país organizados en 25 grupos territoriales. Se origina en el Programa Rescate y Revalorización de Semillas Criollas y Soberanía Alimentaria que en el año 2004 comenzaron a llevar adelante la Asociación de Productores Orgánicos del Uruguay (APODU) y la ONG REDES-AT, con la participación de la Facultad de Agronomía a través del Centro Regional Sur. En el año 2006 esta iniciativa fue declarada de Interés Ministerial por parte del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Además de promover el uso e intercambio de semillas criollas, esta Red desarrolla proyectos educativos y de promoción cultural en torno al tema y promueve el acceso a tierras por parte de jóvenes. Cada dos años organiza la Fiesta Nacional de la Semilla Criolla, evento que convoca a cientos de personas, entre ellas a autoridades de gobierno vinculadas con la temática.

El cultivo de maíz transgénico está autorizado en Uruguay desde el año 2003 cuando se aprobó el evento MON810 de la empresa Monsanto. Desde entonces y hasta finalizado el año 2019 se han aprobado trece eventos transgénicos en maíz para su cultivo comercial. En conjunto estos eventos portan transgenes de origen bacteriano que codifican para proteínas que les confieren tolerancia a

herbicidas o los hacen tóxicos para larvas de ciertos lepidópteros y coleópteros (MGAP-GNBio, 2019). El Decreto Presidencial 353/008 del 21 de julio de 2008 es el que regula los aspectos vinculados a la bioseguridad de vegetales genéticamente modificados (GM) (MGAP-GNBio, 2009). Este decreto establece como política de Estado la “coexistencia regulada” entre vegetales GM y no-GM. En la actualidad no existe ninguna medida dictada por la autoridad competente, el Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio), que promueva la coexistencia. No existen normas que regulen el manejo de los cultivos de forma de evitar cruzamientos no deseados, o que regulen la cadena de producción, almacenamiento y distribución de forma de evitar mezclas involuntarias de materiales GM y no-GM.

Desde la liberación de los primeros cultivos transgénicos de maíz, la posibilidad de contaminación de variedades criollas con cultivares transgénicos planteó un nuevo obstáculo para su conservación. La presencia de transgenes en estas variedades afecta la identidad no-GM del cultivo y desestimula su conservación por parte de los productores. En el caso del maíz los riesgos de contaminación son altos dada la biología reproductiva del cultivo, el manejo cultural que hacen los productores de sus semillas y la omnipresencia de las variedades transgénicas de maíz en el mercado semillerista. Un estudio realizado en 2008 por investigadores de las Facultades de Agronomía, Química y Ciencias de la Universidad de la República en convenio con REDES-AT mostró que en Uruguay existe flujo de transgenes desde cultivos de maíz GM a cultivos no-GM aún en situaciones en las que se respetaron las distancias establecidas por la reglamentación de aquel momento (250 metros) (Galeano et al. 2010).

En las zafas 2017/18 y 2018/19 se sembraron respectivamente 71 mil y 107 mil hectáreas de maíz en Uruguay (MGAP-DIEA, 2018 y 2019). Según el sector privado en la zafa 2017/18 el 98% del área se sembró con semillas transgénicas (ISAAA, 2017). También según ISAAA, el 96% del área de maíz transgénico correspondió a eventos apilados con más de un transgen que son tolerantes a herbicidas (glifosato) y producen toxinas Bt. El 4% restante

correspondió a cultivos con tolerancia a herbicidas. Sin embargo, algunos/as productores/as familiares continúan sembrando maíz no transgénico y son estos los que mantienen semillas criollas. Los riesgos de contaminación de los maíces no-GM con transgenes son altos ya que las áreas de cultivo de maíz GM son mucho mayores que las de maíz no-GM y en los centros de acopio y venta de semillas y granos predominan los maíces GM sin que se cuente con un sistema de etiquetado adecuado en el caso de los granos.

Desde el año 2013, mediante un convenio entre REDES-AT y la Fundación para el Progreso de la Química (FUNDAQUIM) de la Facultad de Química de la Udelar con el apoyo de la Fundación Heinrich Böll, se viene realizando un relevamiento de la presencia de transgenes en semillas de maíz utilizadas por productores de la Red de Semillas Nativas y Criollas. En el Laboratorio de Bioquímica de esta Facultad se realiza el análisis de la presencia de proteínas transgénicas en las muestras de semillas enviadas por técnicos/as y productores/as de la Red de Semillas. En colaboración con el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de Facultad de Ciencias se realiza la identificación de transgenes.

En el presente informe se presentan los resultados del análisis de las muestras de semillas de maíz de la Red de Semillas colectadas en 2018 y 2019.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras

Las muestras fueron colectadas en 2018 y 2019 por productores/as y técnicos/as de la Red de Semillas siguiendo un instructivo de forma de que las mismas fuesen representativas de las poblaciones a analizar. Para su elaboración se contó con la colaboración del Dr. Rafael Vidal del Departamento de Biología Vegetal de Facultad de Agronomía. El mismo se elaboró teniendo en cuenta estándares internacionales (normas ISTA).

Durante 2018 se recibieron 20 muestras y en 2019 se recibieron 7. Las semillas procedieron de los departamentos de Artigas, Canelones, Colonia, Montevideo, Paysandú, Rocha, San José, Tacuarembó y Treinta y Tres.



Detección de proteínas transgénicas

Para cada muestra se analizó la presencia de las proteínas Cry1Ab, Cry1F y CP4 EPSPS de forma de cubrir todos los eventos transgénicos en maíz aprobados en Uruguay. Se analizaron 300 granos de cada muestra.

Las determinaciones se realizaron por el método de DAS-ELISA. Se utilizaron PathoScreen kits for Bt-Cry1Ab/1Ac protein (PSP 06200), Bt-Cry1F protein (PSP 10301) y CP4 EPSPS protein (PSP 74000), todos de la empresa Agdia Inc (Indiana, USA), procediéndose según las instrucciones del fabricante. Los extractos acuosos de proteínas solubles fueron preparados en buffer PBS-T pH 7.4 a partir de 300 granos molidos. Para el análisis de la proteína CP4 EPSPS, el buffer de extracción fue suplementado con leche descremada deshidratada (4 gr/L) y Tween 20 (5 gr/L). En todos los ensayos se utilizaron controles positivos y negativos comerciales (Agdia Inc, Indiana, USA).

Detección de transgenes

Para las muestras de 2018 se confirmó transgenicidad y se realizó identificación de eventos mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR Green. A partir de 300 granos molidos por muestra se realizó extracción de ADN por el método de Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando primers específicos para el promotor CaMVp35s para confirmar transgenicidad. Para identificación de eventos se utilizaron primers específicos para los eventos MON810, BT11, NK603, TC1507 y GA21. Se utilizaron como controles positivos y negativos Materiales de Referencia Certificados (MRC) del Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Bélgica).

Análisis de datos

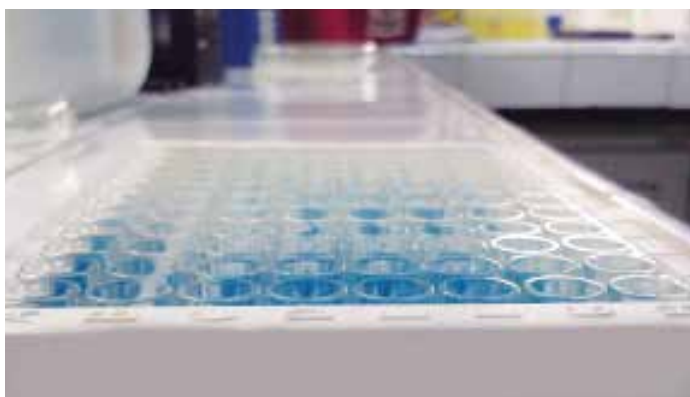
Se define Pd como la probabilidad de detectar al menos un individuo positivo en una población de n individuos, según la fórmula:

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

donde S es el número de individuos analizados (n) por muestra, asumiendo que los individuos positivos están distribuidos con una frecuencia uniforme p (Piñeyro-Nelson et al. 2009). Para una muestra de n individuos, hay una Pd del 95% para una $p=1-\sqrt[n]{0.05}$. En los casos en que no se detecta ningún positivo, se puede afirmar con un 95% de confianza que la frecuencia con la que se encuentran individuos que expresan la proteína transgénica es $p < 1-\sqrt[n]{0.05}$.

Se analizaron 300 individuos por muestra de forma tal que de no detectarse ninguno que expresase proteínas transgénicas pueda afirmarse con un 95% de confianza que para ese lote de semillas muestreadas la frecuencia (p) con que se encuentran individuos GM es menor al 1% ($<1/100$).

Para dos de los casos en que se detectaron individuos transgénicos se procedió a estimar la frecuencia de éstos en la población. Para ello se analizaron 1800 individuos de cada muestra en 12 grupos de 150. En cada grupo se detectó presencia o ausencia de proteínas transgénicas. En base al número de grupos que dio positivo para proteínas transgénicas se estimó el número total de individuos transgénicos en cada muestra utilizando el análisis estadístico para distribuciones hipergeométricas.



Resultados

De las 20 muestras analizadas en 2018, 7 expresaban proteínas transgénicas. Tres de ellas dieron positivas para la proteína Cry1Ab y cuatro para Cry1F. Para estas siete muestras se confirmó transgenicidad dando positivas para el promotor CaM-Vp35s.

Los eventos identificados fueron BT11 y MON810 para las que expresaban Cry1Ab, y TC1507 para las que expresaban Cry1F. De las 7 muestras analizadas en 2019 una dio positiva para las tres proteínas transgénicas testeadas (Cry1Ab, Cry1F y CP4EPSPS). Para esta muestra no se realizó identificación de evento (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del análisis de muestras en las que se detectaron proteínas transgénicas.

Muestra	Proteínas detectadas	Evento identificado	Departamento de origen
R18-06	Cry1Ab	BT11	Colonia
R18-07	Cry1F	TC1507	Tacuarembó
R18-13	Cry1Ab	MON810	Montevideo
R18-14	Cry1F	TC1507	Canelones
R18-16	Cry1Ab	MON810	Canelones
R18-18	Cry1F	TC1507	Canelones
R18-20	Cry1F	TC1507	Canelones
R19-04	Cry1Ab, Cry1F, CP4EPSPS	s/d	Treinta y Tres

A excepción del noroeste, se detectaron transgenes en muestras provenientes de las demás regiones del país. En todos los casos se trató de maíces criollos algunos de ellos con un histórico de más de 50 años de conservación.

Para las muestras R18-13 y R18-14 se estimó la frecuencia de individuos transgénicos en la población analizando 12 bulks de 150 semillas en cada muestra por DAS-ELISA. En base al número de bulks positivos y negativos se estimó que para la primera muestra la frecuencia de individuos transgénicos es

de 0,7% y para la segunda 0,6 %. Este cálculo se hizo utilizando el análisis estadístico para distribuciones hipergeométricas.

De los siete años en que se analizaron muestras de maíz de productores de la Red de Semillas, en seis de ellos se detectó presencia de transgenes en alguna de las muestras (Tabla 2).

Tabla 2.

Resultados de la detección de transgenes en muestras de maíz de productores de la Red de Semillas en los años 2013 al 2019.

Año	Nº de muestras	Muestras positivas	Proteínas detectadas	Procedencia muestra positivas
2013	8	4	Cry1Ab	Treinta y Tres, Canelones
2014	18	3	Cry1Ab	Treinta y Tres, Canelones
2015	9	0	-	-
2016	12	4	Cry1F	Canelones
2017	24	5	Cry1Ab / Cry1F / CP4EPSP	Treinta y Tres, Canelones
2018	20	7	Cry1Ab / Cry1F	Canelones, Colonia, Tacuarembó, Montevideo
2019	7	1	Cry1Ab, Cry1F, CP4EPSPS	Treinta y Tres

Conclusiones

En trabajos anteriores realizados en Uruguay sobre flujo de transgenes entre cultivos de maíz se encontró que se dan eventos de interpolinización entre cultivos GM y no-GM que tienen como consecuencia la presencia de transgenes en la progenie de cultivos no-GM. Además de la interpolinización, la falta de etiquetado y trazabilidad de los granos GM, las mezclas en las cadenas productivas y el manejo cultural que los productores hacen de las semillas de maíz, hacen que sea altamente probable que los cultivos de maíz no transgénicos presenten individuos transgénicos.

En este trabajo se monitoreó en particular la presencia de transgenes en semillas de maíz utilizadas por productores vinculados a la Red de Semillas Nativas y Criollas. De las veinte muestras analizadas en 2018, se detectaron transgenes en siete de

ellas y de las siete analizadas en 2019 se detectaron proteínas transgénicas en una. Desde el año 2013 se vienen detectando transgenes en muestras de maíz de productores de la Red de Semillas a excepción del año 2015.

Estos datos confirman que en Uruguay las variedades de maíz criollo están introgresando transgenes. Esto tiene consecuencias negativas en cuanto a la identidad y la posibilidad de conservación in situ de estas variedades. Tiene además consecuencias económicas negativas para productores agroecológicos que comercializan su maíz como orgánico dado que la presencia de transgenes inviabiliza su comercialización como tal.

Si bien la normativa vigente indica que la política a seguir por el Estado es la 'coexistencia regulada' entre distintas modalidades productivas, actualmente no hay en Uruguay una reglamentación que ampare a los productores de maíz criollo y/u orgá-

nico. La detección de transgenes en sus semillas hace que los productores dejen de multiplicarlas y acudan a otros productores para obtenerlas, lo que reduce la diversidad de poblaciones de maíz criollo. Si no se toman medidas de manejo a partir de una reglamentación que ampare el derecho a producir cultivos no-GM, será cada vez más frecuente encontrar variedades de maíz criollo expresando proteínas transgénicas.

Agradecimientos

Agradecemos al Programa Uruguay Sustentable de REDES-AT y a la Fundación Heinrich Böll por impulsar y financiar este trabajo.

Agradecemos especialmente a los/as productores/as que aportaron sus semillas y brindaron información imprescindible para la realización de este estudio. Agradecemos además a Guillermo Galván, Bettina Porta y Rafael Vidal por aportar información valiosa para la realización de este informe. A Laura Franco Fraguas por su orientación y gestiones para posibilitar la ejecución de este trabajo.

Participaron en este estudio, Pablo Galeano, Francisco Potter, Mailén Arleo, Claudio Martínez Debat Marcelo Fosatti, Mariano Beltrán, Silvana Machado y Poppy Brunini.

Referencias

Berretta A, Condón F, Rivas M, 2007. Segundo informe país sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Acceso en Marzo 2014. <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Uruguay.pdf>

Brown WL, 1975. A broader germplasm base in corn and sorghum. Ann. Hybrid Corn Sorghum Ind. Res. Conf. Proc. 1975 v. 30 p. 81-89.

Clement CR, 2007. "Conservação on farm." En: Recursos genéticos vegetais. pp. 511-543.

De María F, Fernández GM, Zoppolo JC, 1979. Caracterización

agronómica y clasificación racial de las muestras de maíz coleccionadas en Uruguay bajo el proyecto I.B.P.G.R. Tesis Ing. Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Galeano P, Martínez Debat C, Ruibal F, Franco Fraguas L, Galván GA, 2010. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. Environ. Biosafety Res. 9: 147–154. Disponible en: <http://www.ebr-journal.org/action/displayJournal?jid=EBS>.

Harlan JR, 1972. Genetics of disaster. Journal of Environmental Quality 1.3: 212-215.

ISAAA 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.

Maxted N, Hawkes JG, Ford-Lloyd BV, Williams JT, 1997. A practical model for in situ genetic conservation – complementary conservation strategies. In: Maxted, N.; Ford-Lloyd, B.V.; Hawkes, J.G., eds. Plant genetic conservation. London: Chapman & Hall, 1997. p.339-367.

MGAP-GNBio. 2009. Decreto 353/08. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/-decreto_353_008_creacion_cgr_erb_cai_21jul08.pdf MG

AP-GNBio. 2019. Datos disponibles en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/resumen_vegetales_gm_en_uruguay_ago19_comerciales.docx_0.pdf
Consultado en diciembre 2019.

MGAP-DIEA, 2019. Encuesta Agrícola 'Invierno 2019'

MGAP-DIEA, 2018. Encuesta Agrícola 'Invierno 2018'

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.

Van de Wouw M., Kik, C., Van Hintum, T., Van Treuren, R. Visser, B. 2010. Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. Plant genetic resources: characterization and utilization 8: 1-15.



Con el apoyo:  HEINRICH BÖLL STIFTUNG