



FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y
TECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

**“DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN
GRANOS DE MAÍZ UTILIZADOS PARA LA ELABORACIÓN DE HARINA”.**

AUTOR: BQCA. FARM. MARÍA ELENA DAMÚS M.

DIRECTOR: ING. AGR. MSc. PhD. ANDREA ARRÚA

**CO-DIRECTORES: PASTOR ENMANUEL PÉREZ ESTIGARRIBIA Y PhD. JULIO
CÉSAR MASARU IEHISA**

Encarnación – Paraguay

2018

Dedicatoria

A Dios

A mis padres Lázaro y Elena

A mi esposo Diego

A mis hijos Iván y Luana

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por financiar la Maestría en Biotecnología en Alimentos, y de esta manera apoyar a la formación y especialización de profesionales en Paraguay.

A la Universidad Nacional de Itapúa, específicamente a la Facultad de Ciencias y Tecnología por permitir la realización de esta Maestría.

A la Universidad Nacional de Asunción (UNA), por permitirme utilizar el Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), mediante el cual pude realizar la parte práctica de este trabajo.

A mi directora de tesis, Ing. Andrea Arrúa por tanta paciencia y dedicación para que el trabajo de investigación culmine con éxito.

Al Ing. Franco Giménez, por la orientación y ayuda que me brindó para cumplir con uno de los objetivos de esta tesis.

A mi compañera y amiga Johana González, por su gran apoyo y motivación para la culminación de este trabajo.

A mis familiares por el apoyo e incentivo incondicional. A mis hijos por brindarme abrazos de contención. Por último, a Diego, mi amado esposo por ayudarme desde el comienzo de esta maestría, por su amor, dedicación, paciencia y por todo lo que representa para mí.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
INDICE DE CONTENIDO.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	VIII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
OBJETIVOS.....	XV
HIPÓTESIS	XVI
CAPÍTULO I.....	1
REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LA LITERATURA	1
1. MAÍZ.....	2
1.1. Descripción general.....	2
1.2. Distribución geográfica	3
1.3. Componentes estructurales del grano de maíz	4
1.4. Tipos y variedades.....	5
1.5. Importancia del maíz en la alimentación.....	8
2. ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO	9
2.1. Definición.....	9
2.2. Maíz genéticamente modificado	10
2.2.1. Construcción de eventos transgénicos.....	11
2.2.2. Resistencia a insectos	12
2.2.3. Tolerancia a Herbicidas.....	14

2.2.4. Eventos apilados en maíz	15
2.3. Polinización cruzada en maíz	16
2.3.1. Manejo de la finca para reducir la polinización cruzada.....	19
2.4. Eventos transgénicos de maíz aprobados en Paraguay	19
2.5. Legislación Nacional.....	23
2.6. Etiquetado.....	24
3. DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS	24
3.1. Detección fenotípica.....	26
3.2. Detección inmunológica.....	26
3.3. Detección a nivel del ADN introducido	27
CAPITULO II	30
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Estrategia experimental	31
2. Materiales	32
2.1. Muestras	32
3. Métodos.....	32
3.1. Siembra de los granos de maíz.....	32
3.2. Extracción de ADN	33
3.2.1. Verificación de la cantidad y calidad de ADN.....	34
3.3. Detección de transgénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa de punto final.....	34
3.4. Análisis de Datos.....	35
CAPITULO III	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
1. Detección de transgénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa de punto final	39
CAPÍTULO IV	52

CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes estructurales del grano de maíz.....	5
Figura 2. Distribución del endospermo en cinco tipos de maíz	6
Figura 3. Construcción de los Eventos de maíz GM: MON810, GA21, TC1507, MIR162, BT11, MON810XTC1507, NK603, MIR162 X GA21, MON89034.	12
Figura 4. Reacción catalizada por la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fostato sintasa epsps.	15
Figura 5. Esquema de polinización cruzada.....	18
Figura 6. Cultivo de maíz en Paraguay (GM y no GM).....	20
Figura 7. Construcción del transgen que muestra los elementos genéticos y objetivos para la detección de GM basada en ADN.	28
Figura 8. Diagrama de flujo de la metodología de trabajo utilizada durante los análisis de determinación e identificación de transgénesis.	31
Figura 9. Siembra de granos comercializados para la elaboración de harina, disponible en los mercados de los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú.	33
Figura 10. Intensidades de las bandas obtenidas con el programa ImageJ para el marcador y los controles.....	36
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del promotor P-35S-CaMV.	39
Figura 12. Intensidades de las bandas obtenidas con el programa ImageJ utilizando como marcador 161 pb para la detección del promotor P-35S-CaMV.....	40
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del T-nos.	42
Figura 14. Intensidad de las bandas obtenidas con el programa ImageJ utilizando como marcador 130 pb para la detección del terminador T-nos.....	43
Figura 15. Porcentaje de Transgénicos por Departamento.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica del maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	2
Tabla 2: Complejos Raciales de maíz en Paraguay.....	7
Tabla 3: Composición centesimal de los granos de maíz.....	9
Tabla 4: Eventos de maíces resistentes a insectos, aprobados en Paraguay, hasta la fecha.....	13
Tabla 5. Maíces tolerantes al herbicida glifosato aprobados en Paraguay.....	15
Tabla 6. Eventos transgénicos aprobados en Paraguay con rasgos apilados.	16
Tabla 7. Eventos de maíz genéticamente modificados, autorizados en Paraguay.	21
Tabla 8. Maíces genéticamente modificados liberados en Paraguay hasta el año 2016.	22
Tabla 9. Código de las muestras utilizadas en el estudio.	32
Tabla 10. Cebadores y sondas utilizadas en la Reacción de la PCR.....	35
Tabla 11. Comparación de los análisis realizados a las amplificaciones obtenidas de la PCR del promotor P-35S-CaMV.	41
Tabla 12. Comparación de los análisis realizados a las amplificaciones obtenidas de la PCR del terminador T-nos.	44
Tabla 13. Resumen de los dos tipos de análisis para la interpretación de la electroforesis del gel de agarosa.	45
Tabla 14. Concentración de ADN (ng ADN/ μ g de muestra) obtenidas durante la extracción utilizando el método de CTAB modificado.	66

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A: Adenina

a: Alto Paraná

A_{bs}: Absorbancia

a. de C.: Antes de Cristo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BT: *Bacillus thuringiensis*

c: Canindeyú

C: Citosina

CEMIT: Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas

CONBIO: Comisión Nacional de Bioseguridad Agropecuaria y Forestal

CRIA: Centro Regional de Investigación Agrícola

CTAB: Detergente *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*

DGICT: Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica

EDTA: Quelante ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPSPS: 3-glifosfato sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* enolpripúvil-shikimato

g: Gramos

G: Guanina

GM: Genéticamente modificado

GMOMETHODS: La base de datos de la Unión Europea de métodos de referencia para la versión en línea del análisis de OMG

HCl: Ácido clorhídrico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

i: Itapúa

INAN: Instituto Nacional de Alimentación y Nutrición

INFONA: Instituto Nacional Forestal

IPTA: Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria

ISAAA: Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agro-biotecnológicas

Kcal: Kilocalorías

m: Metro/s

M: Molar

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

mg: Miligramos

MIC: Ministerio de Industria y Comercio

mL: Mililitros

MSP y BS: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social

NaCl: Cloruro de Sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio

ng: Nanogramos

nm: Nanómetro

OECD: Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo

OGM: Organismo genéticamente modificado

P-35S-CaMV: Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR en tiempo real

rpm: Revolución por minuto

SEAM: Secretaría del Ambiente

SENACSA: Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal

SENAVE: Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal de Semillas

T: Timina

T-nos: Terminador NOS (nopalina sintasa) de *Agrobacterium tumefaciens*

T-nos F/R: Par de cebadores para la secuencia terminadora T-nos

UNA: Universidad Nacional de Asunción

+/-: Dudoso

μL: Microlitros

35S F/R: Par de cebadores para la secuencia promotora P-35S-CaMV

RESUMEN

El maíz es uno de los productos agrícolas de carácter económico, social y cultural más importante en Paraguay, siendo el ingrediente principal de la mayoría de las comidas típicas, debido a su bajo costo y sencillez de preparación. No existe una reglamentación relacionada al maíz transgénico para el consumo humano, como tampoco se encuentran reguladas las normas para el etiquetado. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la presencia de secuencias transgénicas en granos de maíz comercializados en los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú para la elaboración de harina de consumo humano. Se trabajó con 18 muestras de granos de maíz comercializados para la elaboración de harina procedente de los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú. Se extrajo el ADN genómico de cada una de las muestras utilizando el protocolo de *Cetryl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB). Para la detección de las secuencias transgénicas se emplearon cebadores capaces de amplificar el promotor 35S (P-35S-CaMV) y el terminador de nopalina sintasa T-nos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Los resultados evidenciaron la presencia de cinco muestras positivas para el promotor P-35S-CaMV y cinco muestras para el terminador T-nos. Esto indica que 10 de 18 muestras presentaron secuencias transgénicas en su construcción. Estos hallazgos sugieren que productos transgénicos se encuentran a disposición en los mercados locales paraguayos sin que los consumidores tengan conocimiento de ello, a causa de que no se encuentran debidamente etiquetados. En la actualidad, en Paraguay, no se han reportado estudios de detección de secuencias transgénicas en maíz, convirtiéndose este en el primer reporte.

Palabras clave: Maíz; Secuencias transgénicas; Reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Corn is one of the most important economic, social and cultural agricultural products in Paraguay, being the main ingredient of most typical foods, due to its low cost and simplicity of preparation. There is no regulation related to transgenic corn for human consumption, as well as rules for labeling are not regulated. The objective of this research was to evaluate the presence of transgenic sequences in corn grains marketed in the Departments of Itapúa, Alto Paraná and Canindeyú for the preparation of flour for human consumption. We worked with 18 samples of corn kernels marketed for the production of flour from the Departments of Itapúa, Alto Paraná and Canindeyú. Genomic DNA was extracted from each of the samples using the Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) protocol. For the detection of the transgenic sequences, primers capable of amplifying the 35S promoter (P-35S-CaMV) and the nopaline synthase T-nos terminator were used by the endpoint polymerase chain reaction (PCR). The results showed the presence of five positive samples for the P-35S-CaMV promoter and five samples for the T-nos terminator. This indicates that 10 out of 18 samples presented transgenic sequences in their construction. These findings suggest that transgenic products are available in Paraguayan local markets without consumers being aware of it, because they are not properly labeled. Currently, in Paraguay, no studies have been reported to detect transgenic sequences in corn, which is the first report.

Keywords: Corn; Transgenic sequences; Polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los productos agrícolas más importantes a nivel mundial, en términos de cantidades producidas, consumidas y comercializadas (Wu, 2015). En Paraguay ocupa un área total de 838.768 hectáreas (CAPECO, 2016). Este cereal forma parte de uno de los componentes más importante en la dieta, se consume bajo muchas modalidades, siendo el ingrediente principal de la mayoría de las comidas típicas de Paraguay, en donde la harina es una de las más populares, debido a su bajo costo y sencillez de preparación. La importancia del maíz en Paraguay no sólo se debe a su riqueza en biodiversidad, sino también a su carácter económico-agrícola, social y cultural.

En los últimos años, se ha generado un aumento sostenido de la producción de maíz, siendo que actualmente se desarrollan y cultivan nuevos híbridos y variedades transgénicas con mayor rendimiento, mejores características agronómicas, capaces de resistir a enfermedades y plagas que resultan ser una herramienta importante para afrontar los desafíos climáticos y crecimiento demográfico (Alvarez, 2006; Nicolía *et al.*, 2013; CAPECO, 2016). Además, debido a su estructura vegetativa, existe la posibilidad de que se produzca una mezcla accidental entre el material genéticamente modificado (GM) y no GM, fenómeno denominado polinización cruzada (Devos, Reheul y De Schrijver, 2002; Hernández Ramos, Rodríguez Larramendi y Guevara Hernández, 2017). Los cultivos transgénicos han resultado ser una de las tecnologías más prometedoras para garantizar la seguridad alimentaria mundial y aumentar la productividad de los cultivos (Randhawa, Singh and Sood, 2016).

En el año 2016, se ha reportado que más de 28 países cultivan comercialmente transgénicos, siendo el de mayor área de cultivo Estados Unidos (40 %), seguido por Brasil (23 %), Argentina (13 %), India (6,4 %) y Canadá (6,4 %). Las principales plantaciones a nivel mundial incluyen: soja, maíz, algodón y canola (James, 2016). Según datos del Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agro-biotecnológicas (ISAAA), de los 404 eventos de maíz GM, existen 148 variedades en todo el mundo. En Paraguay hasta el momento se encuentran presentes 19 eventos de maíz aprobados para la liberación al ambiente (Senave, 2017). Si bien los eventos aprobados hasta el momento son pocos en relación con otros países productores de transgénicos, estas cifras mantienen al país como el sexto con mayor área de siembra de organismo genéticamente modificado (OGM) en el mundo y el tercero a nivel de Sudamérica, por detrás de Brasil con 41,9 millones de hectáreas y Argentina con 23,8 millones de hectáreas, teniendo Paraguay 3,6 millones de hectáreas (James, 2016).

En cuanto al etiquetado de los alimentos transgénicos, el mismo varía de acuerdo con las regulaciones de cada país. En algunos es obligatorio y en otros voluntario, inclusive en ciertos países aún no se adoptó una reglamentación específica relacionada a este tipo de alimentos (Wohlers, 2013). Controlar la presencia de OGM se ha convertido en un desafío, como resultado varios métodos analíticos basados en ADN y proteínas han sido desarrollados para la detección de los mismos (Kamle and Ali, 2013). En el año 1997 en Paraguay, se reglamentaron por primera vez las actividades biotecnológicas en el sector agrícola. Para que un evento GM pueda ser comercializado, debe ser aprobado por la Comisión Nacional de Bioseguridad Agropecuaria y Forestal (CONBIO) (Fernández Ríos, Rubinstein and Vicién, 2018).

Los consumidores se han cuestionado sobre la seguridad alimentaria y las legislaciones que existen acerca de los OGM, es por ello que, existe una creciente necesidad de evaluar la seguridad de los mismos y del cumplimiento de los requisitos de etiquetado para dicha verificación (Turkec *et al.*, 2015). En Paraguay existe la posibilidad de contaminación cruzada por ausencia de control por parte de los organismos reguladores, por lo tanto, resulta importante utilizar una técnica sencilla y accesible como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de la presencia de transgénicos en granos de maíz utilizados para la elaboración de harina de consumo humano. No existe una reglamentación relacionada al maíz transgénico para el consumo humano, como así tampoco están reguladas normas para el etiquetado, lo cual garantizaría que los consumidores tengan conocimiento de lo que están consumiendo y puedan tomar decisiones con respecto a la adquisición de estos productos. Ante lo expuesto surge la siguiente pregunta de investigación: **¿Presentan secuencias transgénicas los granos de maíz comercializados para la elaboración de harina de consumo humano en los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú?**

A continuación, se expondrán los diferentes capítulos y sus respectivos contenidos que se ajustan a los objetivos propuestos: en el primer capítulo se describen los antecedentes y se hace una revisión bibliográfica de los diferentes conceptos relacionados al tema de investigación, con sus características correspondientes. El segundo capítulo detalla los materiales y métodos empleados de acuerdo a metodologías validadas. En el tercer capítulo se hace la presentación, descripción, análisis de los resultados y discusión de los mismos de acuerdo con los antecedentes. Por último, en el cuarto capítulo se presentan las conclusiones, en la cual se exponen las consideraciones finales, teniendo en cuenta el objetivo general e hipótesis donde se evidencia el aporte del trabajo de investigación al área.

OBJETIVOS

General

Evaluar la presencia de secuencias transgénicas en granos de maíz comercializados en los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú para la elaboración de harina de consumo humano.

Específicos

1. Determinar la presencia del promotor P-35S-CaMV y el terminador T-nos mediante la reacción en cadena de la polimerasa de punto final.
2. Analizar la presencia de secuencias transgénicas de ADN en las muestras de maíz en estudio.

HIPÓTESIS

Entre los granos comercializados para la elaboración de harina de maíz de consumo humano en los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú se encuentran granos que contienen secuencias transgénicas de ADN.

CAPÍTULO I

REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LA LITERATURA

1. MAÍZ

1.1. Descripción general

La palabra maíz deriva de la lengua arahuaca o arawak *mahiz* (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013). Es un cereal perteneciente a la familia de las Poáceas o Gramíneas, del género *Zea* y especie *Zea mays* Lin, subespecie *mays* (Tabla 1) (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 2003). El género *Zea* se encuentra constituido por cuatro especies, sin embargo, solamente la especie *Z. mays* es económicamente importante, por ende, a ella se relacionan los agentes causales de plagas de interés económico (Méndez Barceló and González Parra, 2014).

Tabla 1. Descripción taxonómica del maíz (*Zea mays* L.).

Taxonomía del maíz	
División	<i>Macrophyllrophyta</i>
Subdivisión	<i>Magnoliophytina</i>
Clase	<i>Nymphaespsida</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i> L.

Fuente: Producción y procesamiento del maíz en Colombia (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013).

El origen del maíz se remonta a los años 8000 y 600 a. de C. en Mesoamérica (México y Guatemala). El ecosistema inicialmente fue de invierno seco estacional con alternaciones de lluvias de verano, en una región montañosa, de cuevas empinadas y sobre roca caliza (Acosta, 2009). Su plasticidad ecológica favoreció su adaptación a una gran variedad de climas diferentes a los propios de su hábitat original (Méndez Barceló and González Parra, 2014).

Botánicamente, *Zea mays* es una especie monocotiledónea de crecimiento anual y ciclo vegetativo muy amplio. Es una planta monoica, con inflorescencias masculina (espiguilla) y femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) que se ubican en diferentes partes de la planta (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013). Las espigas se encuentran encerradas por hojas gruesas o espata comúnmente llamadas “chalias” de unos 7 a 40 cm de largo y cuyas flores forman un conjunto de grandes panojas terminales o inflorescencias masculinas

(*International Life Sciences Institute*, 2006; Wu *et al.*, 2016). Son alógamas, es decir, son propagadas por semillas producidas en su mayoría por polinización cruzada, y dependen del viento para la dispersión del polen. Menos del 5 % de los óvulos son fecundados por el propio polen, en su mayoría provienen de plantas vecinas. Como consecuencia, se vuelve vulnerable hacia la difusión de nuevos alelos dentro de sus poblaciones (Devos, Reheul y De Schrijver, 2002; *International Life Sciences Institute*, 2006, Alvarez, 2006; Wu *et al.*, 2016).

Dependiendo de la variedad, su desarrollo puede durar de 80 a 200 días, teniendo en cuenta como el inicio de la siembra y la finalización de la cosecha (Quist y Chapela, 2001; Grande Tovar y Orozco Colonia, 2013).

El maíz se caracteriza por su potencial uso debido a su amplia diversidad genética. La variabilidad de sus alelos se refleja en su largo proceso de domesticación en diferentes condiciones ambientales y culturales en Mesoamérica. Como consecuencia han surgido nuevos genotipos con características únicas, fundamentalmente fenológicas, adaptativas y de uso para la alimentación (Hernández Ramos, Rodríguez Larramendi and Guevara Hernández, 2017).

La domesticación de esta planta resultó en una especie totalmente dependiente del hombre, eliminándose algunas características ancestrales, tales como los mecanismos de dispersión y latencia de las semillas, y algunas de las estrategias de defensa hacia los enemigos naturales (Acosta, 2009).

1.2. Distribución geográfica

El maíz es el cereal más ampliamente distribuido a nivel mundial y ocupa la tercera posición en cuanto a producción total, luego del arroz y el trigo (Silva Castro, 2005; Hansey *et al.*, 2012).

En los países de Sudamérica, Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Brasil y Uruguay, existe una gran riqueza de genotipos de maíz (Varela, 2011). Este grano forma parte de los principales alimentos en la dieta de la población latinoamericana, proveyendo energía y proteínas (Blanco Valdes, Durañona and Acosta Roca, 2016).

En Paraguay, la producción del maíz se concentra en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú, representando a más del 80 % de la producción. La mayoría de los agricultores usan perforaciones sin labranza buenos volúmenes de fertilizantes y semillas

biotecnológicas. Brasil y Chile son los principales mercados de exportación con aproximadamente 700.000–900.000 toneladas cada uno, el saldo se exporta principalmente a través del puerto uruguayo de Nueva Palmira, siendo destino final de estos envíos Asia sudoriental y África (USDA Foreign Agricultural Service, 2016).

Según la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), el uso del maíz es diferente en los países industrializados y en los países en desarrollo. En los primeros, el maíz tiene poca importancia como alimento, utilizan principalmente para alimentar a los animales o como materia prima para las industrias extractivas. En algunos países en desarrollo, el uso del maíz es el alimento básico para la población, es decir que es un ingrediente importante en la dieta. A nivel mundial, sólo el 21 % de la población total de cereales se consume como alimento (OECD, 2003).

1.3. Componentes estructurales del grano de maíz

Dentro de los componentes estructurales del grano de maíz se encuentran el endospermo, el germen, el pericarpio y la punta (Figura 1) (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013).

El endospermo es el tejido que envuelve al embrión y es el que aporta el alimento para el crecimiento y desarrollo de la semilla. En su composición contiene almidón y gluten. El almidón se ubica en el área lateral y superior del grano, conforma aproximadamente el 70–75 % del grano. El gluten se ubica mayormente en la parte superior del grano. Presenta dos regiones bien delimitadas: 1) El endospermo harinoso, cuya consistencia es suave y de apariencia opaca. Representa el 34 % del peso del endospermo; y 2) El endospermo córneo, cuya consistencia es dura y de apariencia translúcida. Representa el 66 % del peso del endospermo (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013).

El germen es el embrión del maíz. Se ubica en la parte inferior media del grano, representa el 7 % del grano. Contiene un elevado nivel de aceite, aproximadamente de 30 %. La proteína del maíz se denomina *zein* y se encuentra en esta parte de la planta. Por otra parte, el pericarpio es conocido como cascarilla, es la cubierta protectora del grano y ocupa aproximadamente el 23 % de este. Su composición se basa en 40 % de celulosa y 40 % de pentoglican, además presenta un alto contenido de material fibroso (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013).

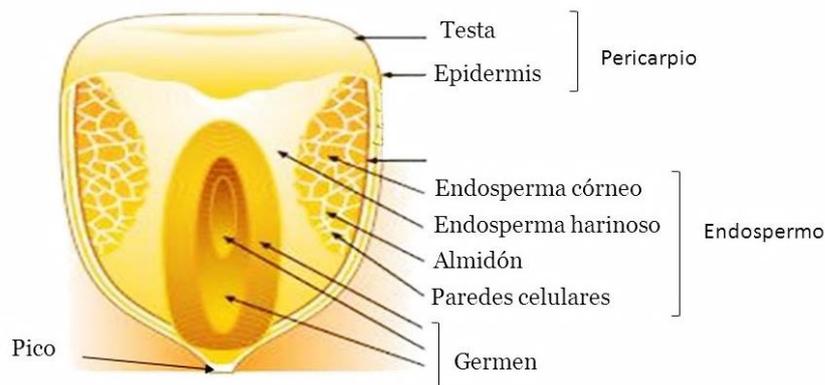


Figura 1. Componentes estructurales del grano de maíz.

Fuente: Zein: The industrial protein from corn (Shukla and Cheryan, 2001).

1.4. Tipos y variedades

El maíz presenta una gran variabilidad en el color del grano, textura, composición y apariencia (Alvarez, 2006). Pueden ser clasificados en distintos tipos según: 1) La constitución del endospermo y del grano, 2) El color del grano, 3) El ambiente en que es cultivado, 4) La madurez y 5) Su uso (FAO, 2017).

Edward Lewis Sturtevant (1899) fue el primero en clasificar al maíz, de acuerdo a la variación que presentan los granos, basándose en la textura y estructura del endospermo como: 1) Maíz tunicado, *Zea mays tunicata* St, es uno de los tipos más primitivos de maíces cultivados, donde cada grano se envuelve en su propia bráctea; 2) Maíz reventón, *Zea mays everta* St., presenta granos pequeños con endospermo cristalino, conformado por almidón córneo, se utiliza para las palomitas de maíz, debido a que, por la acción del calor es capaz de reventar; 3) Maíz cristalino, *Zea mays indurata* St., presenta granos con endospermo vítreo duro, cristalino y translúcido, con almidón en su mayoría córneo; 4) Maíz amiláceo, *Zea mays amilácea* St., tiene granos con endospermo blando, suave amiláceo, presentan un gran tamaño y un alto rendimiento; 5) Maíz dentado, *Zea mays indentata* St., se caracteriza por poseer granos con endospermo formado con almidón córneo cristalino, tanto en el exterior como en el interior. En el fragmento superior, están coronados con almidón blando y suave, cuya madurez produce una depresión central superior, a causa de una mayor hidratación, otorgándole al grano el aspecto característico de diente; 6) Maíz dulce, *Zea mays saccharata* St., son maíces dulces cuyos granos son completamente arrugados cuando llegan a la maduración; y por último 7) Maíz ceroso, *Zea mays ceratina kul*, presenta un aspecto ceroso

en el endospermo. En este tipo, el almidón se encuentra constituido por 100 % de amilopectina, lo que le confiere un aspecto gomoso, parecido de la yuca (Acosta, 2009).

Una clasificación más actualizada citado por David y Tovar (2013), de acuerdo a la composición del endospermo clasifica los maíces como: 1) Maíz harinoso, cuya composición se basa en almidón muy blando y cuya producción mundial representa entre el 10–12 %; 2) Maíz dentado, se caracteriza por presentar a los costados del grano una combinación de almidón del tipo blando y duro. Presenta una apariencia peculiar de “diente” cuando comienza a secarse. Se emplea principalmente en la alimentación animal; 3) Maíz duro o córneo, presenta granos de aspectos redondos, duros y suaves al tacto, cuya constitución se caracteriza por un endospermo córneo, de madurez temprana. Se emplea en alimentos para humanos y en la producción de fécula de maíz; 4) Maíz cristalino, sus granos son lisos y redondos, presenta una gruesa capa de endospermo cristalino que envuelve un centro harinoso, y por último 5) Maíz reventón (palomero), posee un endospermo córneo muy duro y una pequeña porción de almidón suave. Los granos pueden ser de tipo perla (redondeados) o tipo arroz (puntiagudos). Cuando se calienta, la humedad pasa a un estado de vapor que se expande, los granos revientan y el endospermo aflora, de esta forma se consume como palomitas de maíz (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013).

Los tipos de maíz más importantes cultivados para grano o forraje son: el duro, el dentado y el harinoso. Los tipos de maíz de menor importancia en comparación a aquellos utilizados como alimento o forraje, pero con un valor económico agregado son: el maíz de tipo dulce para consumir la mazorca, el maíz reventón utilizados para preparar bocadillos y el maíz ceroso (FAO, 2017).

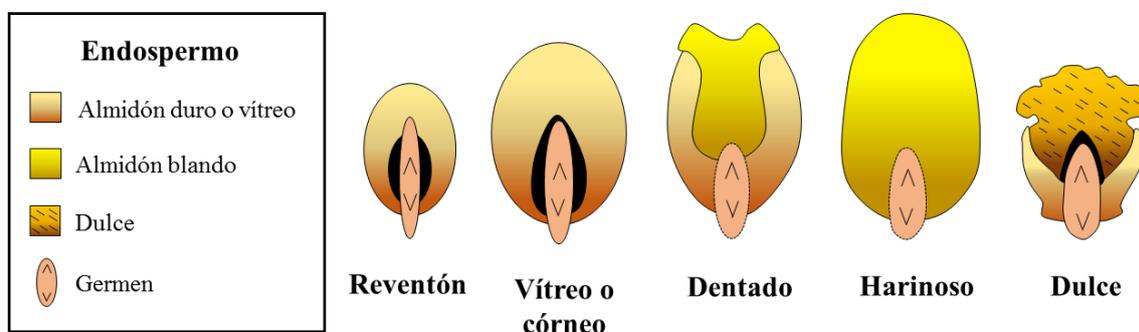


Figura 2. Distribución del endospermo en cinco tipos de maíz

Fuente: Producción y procesamiento del maíz en Colombia (Dickerson, 2003, citado por David y Tovar, 2013).

El término raza se utiliza en el maíz para agrupar individuos o poblaciones que compartan características en común, las razas se agrupan a su vez en grupos o complejos raciales (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2017). En Latinoamérica, entre los países con mayor número de razas de maíz se encuentra Perú con 52, Argentina con 43, México con 41 y Bolivia con 40, todas ellas ligadas con tradiciones históricas, medicinales, religiosas y gastronómicas (Salhuana y Pollak, 2006; Hernández Ramos *et al.*, 2016). En un estudio de razas de maíz descritas en América del Sur, se ha encontrado que aproximadamente el 40 % de las mismas tienen endospermo de tipo harinoso, el 30 % son de endospermo de tipo duro, el 20 % de tipo dentado, el 10 % de tipo reventón y el 3 % son del tipo endospermo dulce (Varela, 2011).

Con relación a la cantidad de razas, el país se encuentra en el número 8 con 10 razas (Salhuana y Pollak, 2006). Existen dos tipos de productores de maíz: pequeño (cultiva para subsistencia usando variedades criollas) y mediano a grandes productores (producen para fabricación de alimentos balanceados para animales o granos de exportación y utilizan semillas híbridas e importadas) (MAG, 2008).

En la Tabla 2 se presentan los complejos raciales que han sido identificados en Paraguay (MAG, 2008). El Banco de Germoplasma de Maíz se encuentra en el Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA) dependiente del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el mismo cuenta con 583 entradas de maíz (Noldin and Machado, 2007).

Tabla 2: Complejos Raciales de maíz en Paraguay.

Raza	Tipo de Grano
Avatí Guapy	Harinoso
Avatí Mita	Harinoso
Avatí Moroti	Harinoso
Avatí Ti	Harinoso
Pichinga Aristado	Reventón
Pichinga Redondo	Reventón
Sapé Moroti	Dentado
Sapé Pyta	Dentado
Tupi Moroti	Duro
Tupi Pyta	Duro

Fuente: Evaluación preliminar de la variabilidad de razas tradicionales de maíz (*Zea mays*) en Paraguay (Noldin and Machado, 2007).

La clasificación comercial del maíz se establece de acuerdo con la demanda en la producción y distribución a nivel mundial, incluyen: 1) El maíz blanco, puede contener hasta un 2 % de otros colores de grano en mezcla. El color paja o rosa debe ser menor al 50 %; 2) El maíz amarillo, puede contener hasta 5 % de otros colores de grano en mezcla, el color rojo puede cubrir hasta un 50 % del grano; 3) El maíz mezclado 1, constituido por maíces de color blanco que contienen entre 5,1–10 % de maíces amarillos y viceversa, en ambos casos, sin sobrepasar el 5 % de maíces oscuros; 4) El maíz mezclado 2, incluye maíces blancos que representan más del 10 % de maíces amarillos y viceversa, en ambos casos, sin sobrepasar el 5 % de maíces oscuros; y por último 5) El maíz pinto, incluye los maíces blancos, amarillos y mezclado, conteniendo más del 5 % de maíces oscuros (rojo, azul y morado) (Grande Tovar and Orozco Colonia, 2013).

1.5. Importancia del maíz en la alimentación

El maíz es una fuente barata de carbohidratos, proteínas y aceites, no solamente se puede emplear en la dieta para consumo humano, sino también en animales, además de otras aplicaciones con cierto valor en la industria como para la producción de bebidas (Megna Francisco, Santos and Rodrigues Viana de Lima, 2016).

La mayor parte de la energía y proteína que consume la población latinoamericana proviene del cultivo de este cereal (Valdés, Galán and Lizazo, 2014). Se produce principalmente para forraje, materia prima de alimentos procesados, producción de etanol y consumo humano (Rodríguez *et al.*, 2016). Está constituido por almidón, azúcares y proteínas y al mismo tiempo genera ingresos económicos a través de la comercialización del maíz (Rodríguez Cortesi and Rabery Cáceres, 2003).

En la Tabla 3 se observan algunos componentes nutricionales presentes en el grano de maíz. El contenido de vitaminas depende de factores tanto extrínsecos como intrínsecos, es por eso que en un mismo país el contenido vitamínico puede presentar importantes diferencias (Alvarez, 2006) .

Tabla 3: Composición nutricional de los granos de maíz

Componente	Cantidad
Almidón	70 %
Proteína	8 – 11 %
Grasa	Relativamente baja
Compuestos bioactivos	Carotenoides, antocianinas, tocoferoles, compuestos fenólicos
Antioxidantes naturales	Ácidos grasos, oleico y linoléico.

Fuente. Contenido de Carotenoides del grano de maíz híbrido cultivado en invernadero (García Flores *et al.*, 2015).

El cultivo de maíz es de gran importancia socioeconómica en Paraguay, constituye una fuente de ingresos para los productores. Cabe destacar que los maíces GM en el país han registrado un incremento sostenido. Actualmente se producen casi 4 veces más que hace 18 años atrás (CAPECO, 2016).

2. ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO

2.1. Definición

De acuerdo a la Ley N° 2309 del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, un organismo genéticamente modificado se define como organismo vivo que posee una combinación nueva de material genético que se ha obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna. Por biotecnología moderna, se entiende la aplicación de técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ADN recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos; o la fusión de células más allá de la familia taxonómica que superan las barreras fisiológica naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional (Poder Legislativo, 2000).

2.2. Maíz genéticamente modificado

Al principio, el maíz fue cultivado y mejorado a partir de procesos de selección basados en necesidades y gustos del hombre, de manera empírica al inicio y posteriormente mediante el mejoramiento genético, esto ha incrementado la producción en maíces nativos y posteriormente en maíces mejorados (Rodríguez *et al.*, 2016).

La producción de híbridos se ha realizado utilizando técnicas de mejoramiento tradicional con las distintas variedades, realizando cruces con variedades similares, siendo esta transformación un proceso natural de reproducción sexual dentro de la misma especie, en la cual, la información de ambos parentales se combina y pasa a la progenie (Hernández Juárez, 2012).

El maíz nativo se ha adaptado a múltiples condiciones agroecológicas, mientras que, el maíz mejorado presenta características más homogéneas, y se encuentra diseñado para adaptarse a condiciones muy específicas como la sequía, resistencia a plagas y enfermedades, y la de mejorar los rendimientos de la producción (Rodríguez *et al.*, 2016).

Actualmente, el 93 % del maíz cultivado en el mundo es transgénico y estos cultivos provocan debates sobre la bioseguridad y la compatibilidad ecológica (Sun *et al.*, 2017). La producción del maíz se ve afectada por factores bióticos y abióticos, es por eso que las nuevas técnicas de ingeniería genética amplían las posibilidades de desarrollar cultivos con propiedades mejoradas a través del conocimiento de los genes involucrados en la susceptibilidad a las enfermedades e insectos, entre otros (Vital López *et al.*, 2015).

Los cultivos GM con rasgos deseados se desarrollan con la introducción de un gen de interés empleando herramientas de ADN recombinante, denominados transgenes, y son capaces de conferir un nuevo rasgo a la planta o mejorar un rasgo ya existente (Randhawa, Singh and Sood, 2016). El OGM es capaz de expresar diferentes productos genéticos que no son propios de la especie, confiriéndole así resistencia a insectos, virus, tolerancia a los herbicidas o mejorar el valor nutricional (Rabiei *et al.*, 2013).

Los maíces transgénicos mayormente cultivados son los que contienen los eventos Bt11 y MON810, según el último informe presentado por el ISAAA (ISAAA, 2016).

Con los cultivos GM resulta posible la reducción del empleo de insecticidas químicos, por tanto, proporcionan un beneficio para la salud y para el medioambiente, además de generar mayor productividad aumentando el ingreso de los agricultores (Oliveira *et al.*, 2016).

2.2.1. Construcción de eventos transgénicos

La construcción de los transgenes que se encuentran en el mercado actualmente presenta los siguientes componentes: 1) Dos fragmentos de ADN que delimitan el inicio (secuencia promotora) y el final (secuencia terminadora). La secuencia promotora permite la expresión del gen insertado; el más empleado es el promotor 35S proveniente del virus del mosaico de la coliflor; 2) El transgen insertado, que le otorga un rasgo específico a la planta huésped, es el gen estructural que codifica la expresión que le confiere el carácter transgénico; y por último 3) El gen marcador para la selección de transformantes, cuya misión es marcar las células de los embriones de maíz que han sido transformadas para posteriormente ser aisladas y desarrolladas en condiciones de cultivo de tejido y de esta manera, regenerar las plantas (Corona, Uffo y Martínez, 2006; Turrent Fernández *et al.*, 2009; Randhawa, Singh y Sood, 2016).

La construcción transgénica tiene como función inducir a la planta a producir una proteína específica. Es así como la proteína codificada por el gen marcador y el gen de selección reside en la misma planta. El grupo formado por el promotor constructivo 35S, el gen estructural, el gen marcador y el gen de selección, se encuentran activados de manera permanente en todas las células de la planta, en paralelo a la acción del ADN residente (Turrent Fernández *et al.*, 2009).

Existen diversos métodos para la inserción de la construcción en el genoma del maíz; entre los más empleados se encuentran la biobalística y el agrolístico, este último utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. La biobalística es el método más utilizado en las transformaciones comerciales de maíz, sin embargo, presenta una desventaja que consiste en las copias redundantes del inserto transgénico (Turrent Fernández *et al.*, 2009).

En la Figura 3 se observa la construcción de algunos eventos aprobados en Paraguay, hasta la fecha, destacando la presencia del promotor 35S y el terminador T-nos que se encuentran presentes en todos los eventos.

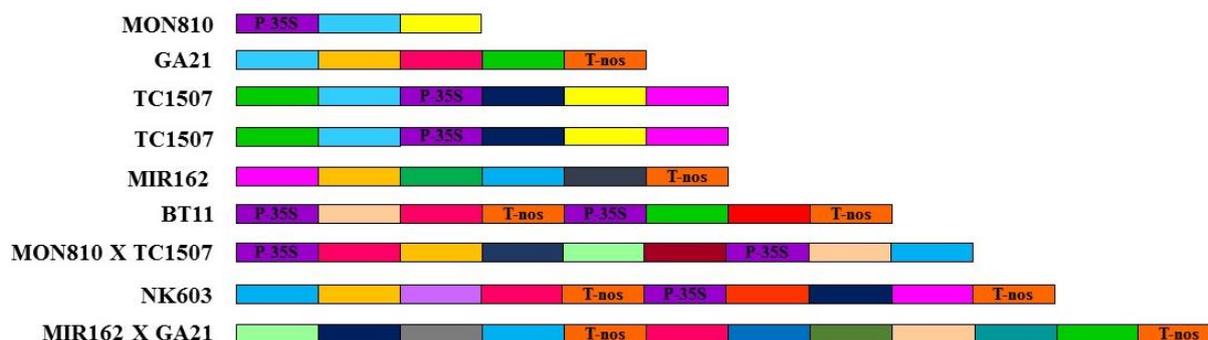


Figura 3. Construcción de los Eventos de maíz GM: MON810, GA21, TC1507, MIR162, BT11, MON810XTC1507, NK603, MIR162 X GA21, MON89034.

Fuente: Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología (CIISB, 2016). Búsqueda de OVM, genes u organismos.

2.2.2. Resistencia a insectos

El maíz convencional sembrado en Paraguay sufre serios daños causados por plagas de difícil control que también ocasionan pérdidas significativas a la producción en los países vecinos (Gomez *et al.*, 2017).

Actualmente, el maíz transgénico resistente a insectos comercializado en el mercado expresa genes del *Bacillus thuringiensis* (Bt) que producen proteínas de esta bacteria que es capaz de matar a algunas plagas clave. Estos productos transgénicos se denominan comúnmente maíz Bt. En los últimos 14 años, los productos derivados de los cultivos transgénicos que expresan proteínas Bt se consumen de forma segura como alimentos y piensos (Chilcutt y Tabashnik, 2004; Baktavachalam *et al.*, 2015).

Dentro de los maíces Bt, el gen Cry1Ab es el más empleado, fue transferido a 6 variedades de maíz. Su acción se basa en la unión selectiva a sitios específicos en el intestino de los insectos susceptibles, generando poros que interrumpen el flujo de iones, lo que causa parálisis y la muerte del insecto (Arleo, 2015).

Se ha reportado que estos cultivos controlan *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Pectinophora gossypiella*, *Ostrinia nubilalis*, *Diatrea grandiosella* y *Pseudoplusia includens* (Diaz Granados, Sandoval y Chaparro-Giraldo, 2013; Cera-gmc.org, 2016). Este gen presenta acción tóxica únicamente sobre lepidópteros y cuya especificidad de acción es atribuible a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blancos. No existen sitios de unión para delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de

mamíferos, por lo tanto, los animales no son susceptibles a estos (Cera, 2015). El gen Cry1Ab también reduce la contaminación por micotoxinas en maíz Bt, disminuyendo *Fusarium spp.* (Furgal-Dierzuk *et al.*, 2014). En la Tabla 4 se presentan los tres eventos de maíces resistentes a insectos aprobados en Paraguay.

Tabla 4: Eventos de maíces resistentes a insectos, aprobados en Paraguay, hasta la fecha.

Característica conferida	Genes Expresados	Empresa	Resolución MAG N°
Resistencia a lepidópteros	Cry1Ab	Monsanto	888/12
	Cry1Ab.105 y cry2Ab2	Monsanto	816/13
	Vip3A19	Syngenta	241/14

Fuente: Listado de eventos de modificación genética liberados comercialmente en el país (Senave, 2017).

Referencia: MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería.

2.2.2.1. Generalidades del *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta, presenta flagelos y mide aproximadamente 3–5 µm de largo por 1–1,2 µm de ancho. Es un entomopatógeno utilizado como agente de control microbiano en bioinsecticidas (Hernández Juárez, 2012).

Las proteínas Cry se definen como proteínas paraesporales de Bt capaces de producir efectos tóxicos hacia algunos organismos. La importancia de estas toxinas radica en su alta selectividad y especificidad contra los insectos objetivo, entre ellos las plagas de los órdenes de lepidóptera, coleóptera, díptera, himenóptera (hormigas), además los ácaros y otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios, que son importantes en la agricultura y la silvicultura. A causa de su empleo como bioinsecticida, se realizó la clonación del gen Cry que es capaz de codificar para proteínas insecticidas (Hernández Juárez, 2012).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* se basa en la activación de las larvas susceptibles luego de la ingestión del complejo espora-cristal. El cristal está compuesto por subunidades polipeptídicas (protoxina) (Hernández Juárez, 2012).

2.2.3. Tolerancia a Herbicidas

Las plantas de maíz pueden ser transformadas con *Agrobacterium spp.*, lo que le confiere tolerancia al glifosato, bajo el control de la expresión de una combinación de promotor e intrón que actúan preferentemente en la expresión génica de tejidos reproductivos vegetativo y femenino (Wu *et al.*, 2016).

Ciertas líneas de maíz han sido modificadas para tolerar la aplicación de herbicidas de uso común en la agricultura moderna. En plantas, utilizando la ingeniería genética la tolerancia a glufosinato de amonio se consiguió mediante la transferencia del gen bacteriano *pat* o *bar*, que codifican la enzima fosfinotricina N-acetil transferasa (*pat*), capaz de inactivar el ingrediente activo del glufosinato de amonio (fosfinotricina) que bloquea la enzima glutamina sintetasa involucrada en el metabolismo del nitrógeno y en la detoxificación de amonio en plantas no transformadas, llevando a la planta a la muerte por intoxicación debido a la acumulación de niveles letales de amonio y deficiencia en la síntesis de proteínas (Carreño-Venegas and Chaparro-giraldo, 2016).

A su vez se han desarrollado variedades “*Roundup Ready*” (ejemplo: evento GA21) modificadas por la transformación de la aceleración de las partículas (biobalística), para tolerancia a la aplicación del herbicida *Roundup*®, cuyo ingrediente activo es el glifosato (Cera, 2014).

El glifosato inhibe a la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3 fosfato sintetasa (*epsps*) (Figura 4), que impide la formación de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina; en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos (Loriths *et al.*, 2017). El glifosato actúa como un inhibidor competitivo del sustrato de la enzima, impidiendo la formación del complejo funcional y su posterior transporte al cloroplasto. Las variedades de maíz genéticamente modificadas con resistencia al herbicida contienen el gen *epsps* proveniente de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (*epsps*). La enzima producida por el gen *epsps* tiene una menor afinidad por el glifosato y es catalíticamente activa en presencia del herbicida. Las variedades transgénicas son capaces de sintetizar los aminoácidos esenciales y como consecuencia sobreviven a la aplicación del mismo (Cera GM crop database, 2014).



Figura 4. Reacción catalizada por la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fostato sintasa epsps.

Fuente: Consumo y regulación de alimentos transgénicos contaminados con Glifosato y su repercusión en la salud (Loriths *et al.*, 2017).

Paraguay actualmente cuenta con dos maíces GM aprobados tolerantes al herbicida glifosato (Tabla 5).

Tabla 5. Maíces tolerantes al herbicida glifosato aprobados en Paraguay.

Característica conferida	Genes Expresados	Empresa	Resolución MAG N°
Tolerancia al herbicida glifosato	Cp4 epsps	Monsanto	19/14
	Pmi y mepsps	Syngenta	669/15

Fuente: Listado de eventos de modificación genética liberados comercialmente en el país (Senave, 2017).

2.2.4. Eventos apilados en maíz

Los cultivos transgénicos que poseen genes apilados son los que tienen más de una modificación genética pudiendo ser resistentes a una o más toxinas Bt y a uno o más herbicidas (Manzur and Cárcamo, 2014)

En Paraguay, de los 19 eventos de maíces transgénicos aprobados, 12 de ellos poseen rasgos apilados como son: resistencia a lepidópteros y coleópteros, tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio (Tabla 6).

Tabla 6. Eventos transgénicos aprobados en Paraguay con rasgos apilados.

Característica conferida	Genes Expresados	Empresa	Res. MAG N°
Resistencia a lepidópteros y coleópteros; Tolerancia al herbicida glifosato	Cry1A.105 y cry2Ab2 cry3Bb, cp4epsps	Monsanto	889/12
Resistencia a lepidópteros; tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	Cry1F y pat	Dow Agrosciences	890/12
	Cry1Ab, pat	Syngenta	891/12
	Cry1F y pat Vip3A19, cry1Ab, pat	Agrotec	890/12
Resistencia a lepidópteros; tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y glifosato	Cry1A.105 y cry2Ab2, cry1A, pat, cp4epsps	Dow Agrosciences	252/14
	Cry1A.105 y cry2Ab2, cry1A, pat, cp4epsps, vip3A19	Dow Agrosciences	1469/17
Protección a ciertos lepidópteros; tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y glifosato	Vip3A920, cry1Ab, pat, pmi y mepsps	Syngenta	669/15
	Cry1Ab, pat, pmi y mepsps	Syngenta	669/15
	Cry1Ab, cp4 epsps, vip3A920, pat, cry1F, pmi	Agar Cros	154/17
	Cry1Ab, cp4 epsps, vip3A920, pat, cry1F, pmi	Agar Cros	428/17
Protección al ataque de ciertos lepidópteros; tolerancia al herbicida glifosato	Vip3A19, pmi y mepsps	Syngenta	669/15
Protección al ataque de ciertos lepidópteros; tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	Cry1Ab, cry1F, pat	Agrotec	669/15

Fuente: Listado de eventos de modificación genética liberados comercialmente en el país (Senave, 2017).

2.3. Polinización cruzada en maíz

La diseminación de transgenes en los cultivos normales o parientes silvestres es un riesgo inherente en la agricultura (Montesinos López *et al.*, 2013). En varios países de América Latina ya ha sido reportada la contaminación transgénica de variedades nativas y parientes silvestres de cultivos nativos (Intriago Barrero and Bravo Velásquez, 2015).

La tasa de dispersión del grano de polen depende de la distancia de la fuente del polen, de la dirección del viento y de la coincidencia de la liberación del polen (Nascimento *et al.*, 2012). El maíz se ha ubicado en una categoría de elevado riesgo para el flujo de genes puesto

que el método más importante para la polinización del maíz es el que se produce por el viento (anemofilia), hasta aproximadamente 20 metros (aunque la distancia máxima alcanzada es 200 metros) (Chaparro Giraldo, Blanco and Lopez Pazos, 2015).

La estructura genética de una variedad de maíz no es estable debido a ciertos factores como las condiciones geográficas y el manejo de flujo de genes entre las poblaciones adyacentes. Frecuentemente, existen superposiciones genéticas interraciales, que se manifiestan en las características morfológicas, fenológicas y de potencial uso de las variedades cultivadas. Las características de las variedades nativas son controladas por la selección que ejercen los agricultores, dependiendo de la cultura y tradición que se le va a dar a cada material en cuestión (Hernández Ramos *et al.*, 2017).

La dispersión del polen se produce a través del viento, por tanto, la transferencia es afectada por aspectos relacionados con la sincronía en tiempos de floración, distancia de aislamiento y condiciones climáticas (Robayo Avendaño and Galindo Mendoza, 2014).

El polen es liberado desde las anteras, en la parte superior de la planta. Las partículas de polen son capaces de alcanzar alturas superiores a 100 m, al aumentar la altura, la viabilidad decrece; esta se ve afectada por las condiciones climáticas y el contenido de agua. Además, las altas temperaturas y humedades relativamente bajas reducen dicha viabilidad (Robayo Avendaño and Galindo Mendoza, 2014).

Las investigaciones de campo utilizan modelos de simulación para analizar espacialmente la dispersión probable de polen en condiciones de vegetación heterogénea (Robayo Avendaño and Galindo Mendoza, 2014).

Se estima que la planta de maíz en un periodo de 5 a 8 días, por cada óvulo producen entre 9.000 y 50.000 granos de polen (Fernández Campos, 2012).

Las distancias de separación recomendadas en los programas tradicionales de mejoramiento genético dentro de los campos de dos hectáreas o más, son de 200 m para mantener la pureza del grano hasta 99 % y 300 m para mantener la pureza del grano hasta 99,5 % (Messeguer *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que los niveles de polinización cruzada disminuyen a medida que aumenta la distancia del campo aledaño. Cuando la distancia del campo aledaño se incrementa de 0,25 a una hectárea, el porcentaje de fertilización cruzada disminuye de 1,77 a 0,83 %, es decir, cuanto mayor sea el tamaño del campo aledaño mayor será su propia masa

de polen formando así una barrera física y competidora para el polen entrante (Devos, Reheul and De Schrijver, 2005)

Por otra parte, la velocidad del viento es la principal variable en la determinación de la cantidad de polen que se esparcirá en el aire, debido a que induce la liberación de los granos de polen desde las anteras. La velocidad con que los granos de polen decantan, depende de fuerzas que se contraponen, la gravedad y las turbulencias de las corrientes de aire que los mantienen suspendidos incluso por varias horas (Galeano *et al.*, 2010).

La liberación del polen se retrasa en los días de lluvia. El polen de maíz se libera principalmente durante condiciones secas, siendo la mayor parte de la liberación diaria durante la media mañana hasta el mediodía (Devos, Reheul and De Schrijver, 2005).

En la Figura 5 se muestra el esquema de la polinización cruzada, que ocurre cuando el polen de una planta aterriza en las sedas (parte femenina) de otra planta, esto ocurre debido a las características estructurales del maíz ya que es una planta de polinización abierta (García Hernández, 2016).

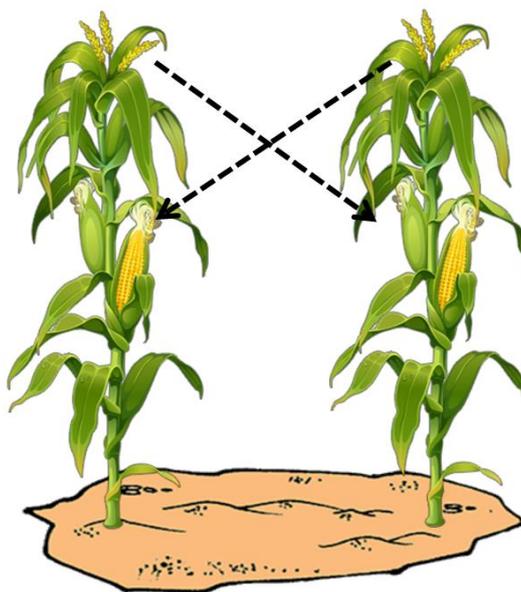


Figura 5. Esquema de polinización cruzada.

Fuente: (Plant and Soil Sciences eLibrary, 2018).

2.3.1. Manejo de la finca para reducir la polinización cruzada

Para la preservación de la calidad genética de las especies nativas del maíz, se han implementado medidas de bioseguridad para el desarrollo de OGM, de manera de controlar la dispersión de flujo polínico de maíz a través del viento (Robayo Avendaño and Galindo Mendoza, 2014).

Algunas medidas que se pueden aplicar con el fin de evitar la contaminación cruzada son: el aislamiento del tiempo (tiempo de floración separado), las zonas de amortiguación y la limpieza del equipo (Schenkelaars and Wesseler, 2016).

Para que se pueda producir con éxito maíz transgénico y convencional, algunos países han establecido normas con medidas prácticas de coexistencia como ser: utilizar distancias de aislamientos prescritas y el uso de barreras rompevientos para evitar la polinización cruzada natural (Baltazar *et al.*, 2015).

El principal objetivo de la coexistencia es mantener la integridad de las materias primas y salvaguardar la libertad de elección de los consumidores. Para ello, es importante minimizar la mezcla no deseada de cultivos transgénicos y no transgénicos. Es un asunto económico que permite satisfacer las necesidades de los clientes mediante la producción de cultivos para diferentes mercados, es decir, no se ocupa de la seguridad de la salud o del medio ambiente. Todos los cultivos transgénicos deben someterse a una evaluación rigurosa y basada en la ciencia antes de su aprobación para el cultivo comercial (Pearsall, 2016).

2.4. Eventos transgénicos de maíz aprobados en Paraguay

El 24 de octubre del 2012, tras haberse cumplido con los procesos establecidos por la normativa vigente, el MAG autorizó la utilización de semillas transgénicas de maíz. En Paraguay, el maíz GM se sembró por primera vez, en 550.000 ha en el 2016, las plantaciones totales de maíz fueron de 310.000 hectáreas (James, 2016). En la Figura 6 se puede observar que la mayor cantidad de transgénicos sembrados en el país corresponde a los que poseen rasgos apilados, representando el 35 % de los cultivos, el 7 % presentan la característica de ser resistente a insectos, el 1 % representa a los tolerantes a herbicidas, y como contraparte se encuentran los maíces no transgénicos, que corresponden al 57 %.

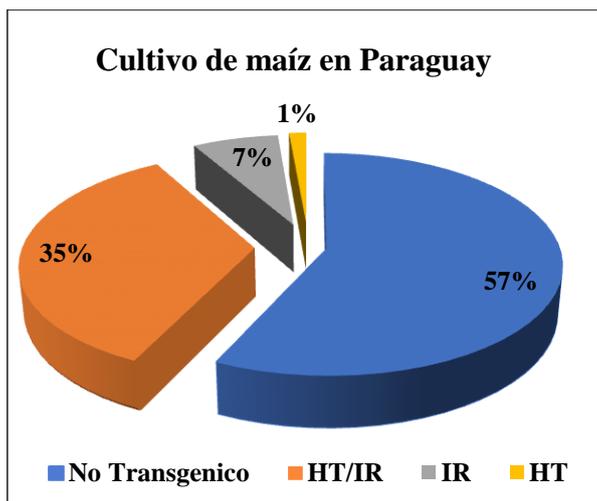


Figura 6. Cultivo de maíz en Paraguay (GM y no GM)

Referencia: IR/HT = Resistentes a insectos y tolerantes a herbicidas; IR = Resistentes a insectos; HT = tolerantes a herbicidas.

Fuente: Breve resumen de ISAAA. Estado global de Biotecnología comercializada. Cultivos genéticamente modificados: 2016 (James, 2016).

Hasta la fecha, Paraguay tiene autorizado 19 eventos de maíz con características agronómicas de resistencia a insectos y/o tolerancia a herbicidas, para su producción y su uso comercial, para consumo directo o procesamiento. Son 5 las empresas que cuentan con la autorización correspondiente: Monsanto (4 eventos), Dow Agrosiencias (3 eventos), Syngenta (7 eventos), Agrotec (3 eventos) y Agar Cros (2 evento) (Senave, 2017).

En la Tabla 7, se presentan los eventos de maíz GM aprobados en Paraguay para su cultivo.

Tabla 7. Eventos de maíz genéticamente modificados, autorizados en Paraguay.

Empresa	Eventos Liberados Comercialmente	Otra Denominación
Monsanto	MON810*	Maíz Yieldgard
	MON89034 x	VT3Pro
	MON88017**	
	MON89034*	VtPro
	NK603	Maíz RR
Dow Agrosiencias	TC1507*	Herculex
	MON89034 x TC1507 x NK603**	Power core
	MON89034 x TC1507 x NK603 x MIR162**	
Syngenta	BT11*	
	MIR162*	
	MIR162 x BT11**	
	MIR162 x BT11** x GA21**	
	GA21	
	MIR162 x GA21**	
	BT11 x GA21**	
Agrotec	TC1507*	Herculex
	MON810 x TC1507**	
	MON810 x TC1507 x NK603**	
Agar Cros	TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603	
	Todas las combinaciones posibles de TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603	

Referencia: * = Refugio 10 % de la superficie sembrada con la tecnología; ** = Refugio 5 % de la superficie sembrada con la tecnología.

Fuente: Listado de eventos de modificación genética liberados comercialmente en el país (Senave, 2017).

Según datos de ISAAA, las características conferidas a los maíces GM son: resistencia a lepidópteros, resistencia a coleópteros, tolerancia al herbicida glifosato, tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. En la Tabla 8 se muestran los genes expresados y sus características conferidas por cada evento.

Tabla 8. Maíces genéticamente modificados liberados en Paraguay hasta el año 2016.

Empresa	Genes Expresados	Características Conferidas
MONSANTO	Cry1Ab	Resistencia a lepidópteros.
	Cry1A.105 y cry2Ab2 cry3Bb, cp4epsps	Resistencia a lepidópteros y coleópteros. Tolerancia al herbicida glifosato
	Cry1A.105 y cry2Abs*	Resistencia a lepidópteros.
	Cp4epsps	Tolerancia al herbicida glifosato
DOW AGROSCIENCIES	cryF y pat	Resistencia a lepidópteros; Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
	Cry1A.105, cry2Ab2, cry1F, pat cp4, epsps,	Resistencia a lepidópteros; Tolerancia los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato
SYNGENTA	Cry1Ab y pat	Resistencia a lepidópteros; Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
	Vip3A19	Resistencia a lepidópteros
	Vip3A19, cry1Ab, pat	Resistencia a lepidópteros Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
	Vip3A920, cry1Ab, pat, pmi y mepsps	Protección a ciertos lepidópteros; Tolerancia los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato
	Pmi y mepsps vip3A19, pmi y mepsps	Tolerancia al herbicida glifosato. Protección al ataque de ciertos lepidópteros
	Cry1Ab, pat, pmi y mepsps	Protección a ciertos lepidópteros; Tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato
AGROTEC	Cry1F y pat	Resistencia a lepidópteros; Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
	Cry1Ab, cry1F, pat	Protección a ciertos lepidópteros; Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
	Cry1Ab x cry1F, pat, cp4 epsps	Protección a ciertos lepidópteros; Tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato
AGAR CROS	Cry1Ab, cp4 epsps, vip3A920, pat, cry1F, pmi	Protección a ciertos lepidópteros; Tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato
	Cry1Ab, cp4 epsps, vip3A920, pat, cry1F, pmi	Protección a ciertos lepidópteros; Tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato

Referencia: Listado de eventos de modificación genética liberados comercialmente en el país (Senave, 2017).

2.5. Legislación Nacional

En el año 2003, Paraguay ratificó el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (CBP), mediante la Ley N° 2309, que tiene como objetivo contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización segura de los OGM resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos y a participar del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología (CIISB) (Poder Legislativo, 2000).

El CIISB es un mecanismo de intercambio de información establecido por el Protocolo de Cartagena para asistir a las partes a implementar el protocolo, facilitar el intercambio de información y experiencia científica, técnica, ambiental y legal sobre los OGM (CIISB, 2017).

El Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semilla (SENAVE), a través de la coordinación de biotecnología, es la encargada en el ámbito agrícola de actuar como secretaría técnica para los eventos vegetales a la cual debe presentarse la solicitud de experimentación de un evento, y, en el caso de reunir los requisitos de forma, la misma es remitida a plenaria de la CONBIO. La supervisión y fiscalización de las condiciones de bioseguridad es llevada a cabo por el SENAVE a través de su Oficina de Coordinación de Biotecnología y de la Dirección General de Operaciones (SENAVE, 2017).

La CONBIO fue creada según Resolución N° 9.699/12, que tiene por objetivo atender, analizar y recomendar en todo lo referente a la introducción, ensayos de campo, liberación pre comercial, liberación comercial y otros usos propuestos de OGMs. Está conformada por representantes de 9 instituciones MAG, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSP y BS), Ministerio de Industria y Comercio (MIC), Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA), Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal de Semillas (SENAVE), Instituto Nacional Forestal (INFONA), Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), Secretaria del Ambiente (SEAM) y la Universidad Nacional de Asunción (UNA) (MAG 2012).

En el año 2012, por Resolución N° 888 del MAG, se aprueba el primer evento en maíz GM para siembra en el país. Este evento es el MON810, denominado también YieldGard® que hasta el día de hoy continúa con la aprobación vigente (MAG, 2012b).

Por otro lado, en cuanto a las regulaciones del etiquetado que indiquen contenido de transgénico de productos envasados en Paraguay en el año 2015 se presentó un proyecto de ley que establece normas de etiquetado de productos destinados al consumo humano que contengan o deriven de OGM. La propuesta se ampara en una norma ya existente, la Ley 1334/98 de la “Defensa del Consumidor y del Usuario” que en su artículo 6 establece que debe haber una “adecuada educación y divulgación sobre las características de los productos y servicios ofertados” (Red Rural, 2016; Base Investigaciones Sociales, 2016).

2.6. Etiquetado

La posibilidad de elección del estilo de vida que desea llevar el consumidor cae en la responsabilidad de las autoridades competentes del estado y de la industria alimenticia sobre el etiquetado del producto (Huang *et al.*, 2014).

La función del etiquetado es conceder información acerca de los que se está consumiendo, por tanto, resulta de vital importancia en alimentos cuyos ingredientes son derivados de OGM, para que, a través de ello, se pueda conocer posibles efectos secundarios que podrían producir, además, ofrece seguridad al consumidor. Los productos etiquetados deberían ser fácilmente identificados y reconocidos, debido a que a través de ello resulta posible rastrear los productos en caso de que fuera necesario (Ribeiro and Marin, 2012). Como se mencionó más arriba, Paraguay no cuenta con una ley que establezca la obligación del etiquetado de los productos que contengan OGM.

3. DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

La sociedad científica ha planteado sus preocupaciones luego de los primeros desarrollos de OGM (Holst Jensen *et al.*, 2012). Existen controversias acerca de la introgresión de transgenes de eventos de OGM al maíz nativo, debido al uso incorrecto de este grano. En la mayoría de los países, existen regulaciones por parte del gobierno, sobre la implementación y el manejo correcto del cultivo de los mismos, para de esta manera, evitar el flujo de genes de los OGM a variedades nativas de polinización abierta. El monitoreo de estos, se puede realizar utilizando métodos analíticos moleculares, basados principalmente en la PCR, para de esta manera, rastrear los eventos en el campo (Zea *et al.*, 2014; Song, Wei y Zhou, 2014).

El muestreo en el campo demanda analizar distintos tejidos del vegetal para poder evaluar el riesgo ambiental: hojas verdes, hojas secas, polen, semillas, tallos y granos. Para que la detección sea reproducible, se debe estandarizar los protocolos de muestreo, los métodos de extracción, la amplificación y la detección de las posibles secuencias de GM exógenas. La estandarización facilita la disponibilidad de los métodos validados por las investigaciones, los materiales de referencia certificados, así como los reactivos y kits de extracción necesarios para poder implementar metodologías adecuadas que puedan utilizarse como rutina (San Juan Bobadillo *et al.*, 2014).

La captura de polen en el aire podría representar un medio no destructivo, rentable de detectar la presencia de OGM en un área determinada antes de la recolección de los materiales o podría proporcionar una herramienta para monitorear los flujos de genes entrantes en una determinada área (Schenkelaars and Wesseler, 2016).

En vista a la necesidad de la implementación de métodos de detección de OGM por la alta demanda de ellos en la industria agroalimentaria, con el fin de discriminar los productos que contienen altos niveles de OGM, superiores al umbral permitido; con el paso del tiempo, se han implementado una serie de técnicas como: 1) El desarrollo de protocolos de purificación de ADN y PCR para aplicar a gran escala; 2) Los métodos de PCR han evolucionado a técnicas cuantitativas (qPCR); 3) El desarrollo de técnicas inmunológicas; 4) El desarrollo y aplicación de programas de trazabilidad e identidad preservada para los OGM (Corona, Uffo and Martínez, 2006).

El fundamento de cada método o tecnología de detección de OGM se basa en la búsqueda de la diferencia entre la variedad no modificada y la planta transgénica. Existen tres metodologías para detectar modificaciones genéticas en los cultivos: 1) La detección fenotípica; 2) La detección a nivel de proteínas por técnicas inmunológicas que son capaces de detectar la presencia de proteínas específicas gracias a la unión específica entre el antígeno expresado y el anticuerpo blanco; y por último 3) La detección a nivel de ADN, mediante la técnica de PCR (Corona, Uffo y Martínez, 2006; Song, Wei y Zhou, 2014). La detección de OGM utilizando análisis de transcripción no es aplicable debido a que se pueden presentar falsos positivos o negativos. Estos métodos basados en proteínas no son confiables para el análisis de alimentos altamente procesados (Mandaci *et al.*, 2015).

En la actualidad, los protocolos existentes son capaces de detectar un evento o grupo de eventos en un cultivo en particular. Sin embargo, ninguno es capaz de detectar en un único

ensayo todos los eventos existentes, por ende, resulta imposible asegurar que una muestra se encuentra libre de OGM con un solo ensayo, sólo es posible asegurar que se encuentra libre de eventos para los cuales se hayan realizado los análisis pertinentes (Corona, Uffo and Martínez, 2006).

3.1. Detección fenotípica

Los rasgos fenotípicos pueden ser empleados como una herramienta de detección de OGM, sin embargo, resulta ser limitado debido, a que generalmente, se requiere distinguir los fenotipos modificados genéticamente y los mutantes naturales (Holst Jensen *et al.*, 2012).

En la actualidad, las plantas que han sido modificadas genéticamente, en general, presentan alguna característica de resistencia a herbicida y/o a insectos. Por ende, la evaluación de la presencia de resistencia puede dar lugar a la identificación de estas plantas GM (Holst Jensen *et al.*, 2012)

Para evaluar la resistencia a insectos, se emplean ensayos biológicos complejos y de larga duración. La desventaja que presentan estos tipos de ensayos es el factor tiempo y que además, no resulta práctico realizar el análisis en muestras de granos. Sin embargo, la resistencia a herbicidas puede ser evaluada por ensayos en laboratorio y en campo, donde resulta posible observar los resultados de diferenciación entre una planta GM resistente a herbicida y una planta natural (Corona, Uffo and Martínez, 2006).

3.2. Detección inmunológica

El genoma alterado del OGM puede llevar a la expresión de alguna proteína nueva, por ende, resulta posible la detección de los mismos a través de la identificación de la nueva proteína expresada, codificada por el material genético (Corona, Uffo and Martínez, 2006).

Los ensayos de detección inmunológicos para la detección de OGM incluyen: 1) Tiras reactivas o *strips* de flujo lateral y 2) El ensayo de inmunodetección ligado a enzima (ELISA). Las tiras de flujo lateral proporcionan de manera rápida la presencia de rasgos GM, por ende, pueden ser empleadas para testear en campo, son de carácter cualitativo, relativamente baratas y simples de usar (Corona, Uffo and Martínez, 2006).

Por otra parte, la técnica de ELISA puede ser cualitativa o semicuantitativa, es capaz de identificar a la proteína relacionada a un determinado rasgo GM. Su costo es relativamente bajo o medio (Corona, Uffo and Martínez, 2006).

Ambos métodos presentan limitaciones relacionadas con el tratamiento térmico o productos procesados debido a que las proteínas se encuentran altamente desnaturalizadas (Cottenet *et al.*, 2013). Los métodos basados en la detección de proteínas dependen del nivel de expresión de las proteínas específicas, que a su vez dependen de los tejidos vegetales y el estado de desarrollo de la planta (Fraiture *et al.*, 2015).

3.3. Detección a nivel del ADN introducido

La PCR es un método de alta sensibilidad y alta especificidad que permite la amplificación de un fragmento de ADN de interés (Corona, Uffo and Martínez, 2006). Mediante este método es posible detectar cualquiera de los tres segmentos de OGM (el promotor, gen de interés introducido y el terminador), siempre y cuando se utilice el cebador adecuado, cuya secuencia se diseña a partir de una secuencia conocida de los elementos indicados (Corona, Uffo y Martínez, 2006; Eugster *et al.*, 2014).

Estos segmentos específicos de ADN pueden ser visualizados luego de la separación a través de la electroforesis en gel y comparado con fragmentos de tamaños ya conocidos (marcadores de peso molecular). Actualmente existen variantes de la técnica de PCR que tienen mayor sensibilidad, y además son reconocidos internacionalmente y recomendado para los análisis de OGM (Cottenet *et al.*, 2013; Rivera Bustamante, Trejo Saavedra y Rodríguez Negrete, 2015)

Una técnica rápida, sensible y cuantitativa es la PCR en tiempo real o qPCR; sin embargo tiene varias limitaciones como es la necesidad de usar calibrante, entre otros (Gutierrez Angoa *et al.*, 2015). La cuantificación de secuencias amplificadas de OGM puede llevarse a cabo luego de la finalización de la PCR (análisis de punto final) mediante este método llamado cuantitativo o durante la PCR (análisis de tiempo real) que analiza la cantidad del producto sintetizado durante la PCR, estimado directamente por la medida de la fluorescencia en la reacción de PCR (Corona, Uffo and Martínez, 2006).

En la base de datos de la Unión Europea de métodos de referencia para la versión en línea del análisis de OGM (GMOMETHODS) se encuentran publicados métodos de PCR

(cualitativos y cuantitativos) para la detección de eventos distintos y genes endógenos para las especies de maíz, soja, algodón, canola, papa, arroz y remolacha azucarera (European Commission, 2016).

En función del nivel de especificidad, los métodos de detección de OGM basados en PCR se clasifican en: rastreo de secuencias de promotor y terminador, métodos específicos de genes, métodos específicos de construcción y métodos específicos de eventos (Figura 7) (Randhawa, Singh and Sood, 2016).

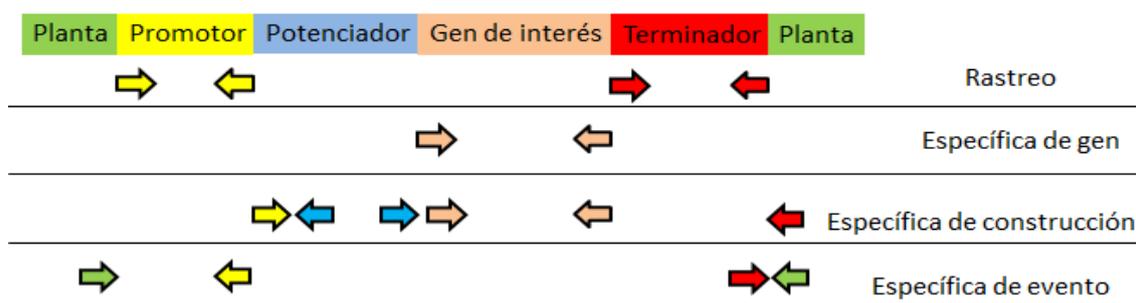


Figura 7. Construcción del transgen que muestra los elementos genéticos y objetivos para la detección de GM basada en ADN.

Referencias: Las posiciones del cebador se representan mediante flechas.

Fuente: DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain (Randhawa, Singh and Sood, 2016).

La prueba de la presencia de secuencias del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (P-35S-CaMV) y el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos) son ampliamente utilizadas en muchas plantas GM, ya que la mayoría o todos los eventos o productos de GM en el comercio contienen uno u otro, o ambos (Zahradnik *et al.*, 2014).

Por mucho tiempo se han utilizado para rastreo de OGM el promotor P-35S-CaMV y el terminador T-nos, sin embargo actualmente muchos investigadores consideran insuficientes y se han aumentado a seis promotores, cuatro terminadores y genes estructurales como cry derivados de *Bacillus thuringiensis*, el gen bar de fosfotricina acetiltransferasa derivado de *Streptomyces hygroscopicus* y pat *Streptomyces viridochromogenes* a la etapa de selección (Park, Kim and Kim, 2017).

Cada año se liberan nuevas variedades de OGM al mercado mundial con secuencias genéticas diversas, por lo que el análisis de los mismos en alimentos enfrenta grandes desafíos

y se prevé que la situación sea más complicada en los años siguientes. Para abordar estos desafíos, será necesario continuar con el desarrollo de nuevas técnicas para la detección, identificación y cuantificación de los mismos (Milavec *et al.*, 2014).

El éxito del método de detección de OGM utilizando PCR depende de factores esenciales: 1) Integridad del ADN; 2) Origen de la muestra y proceso de extracción; 3) Cantidad de la muestra, y 4) Diseño de cebadores (Mas *et al.*, 2016).

Debido a la especificidad de los métodos basados en la detección de transgenes utilizando PCR resultan adecuados para la vigilancia en el campo de OGM. Sin embargo, es necesario evaluar su desempeño, debido a que, como se mencionó, la calidad de la preparación de ADN puede influir independientemente al método empleado para la extracción (San Juan Bobadillo *et al.*, 2014).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estrategia experimental

En este trabajo, el método utilizado para la detección e identificación de transgénicos (Figura 8) se basó en la extracción de ADN de plántulas generadas a partir de granos de maíz utilizados para la realización de harina de consumo humano. El análisis de ADN se llevó a cabo utilizando una técnica molecular, que emplea cebadores específicos para la detección de transgénicos. La resolución de los amplicones obtenidos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los resultados de las muestras problemas se compararon con controles positivos y negativos de maíz transgénico. Los análisis fueron realizados utilizando dos métodos: visual y con el programa ImageJ.

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), dependiente de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica (DGICT) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), ubicado en la ciudad de San Lorenzo, Paraguay, durante el mes de agosto del año 2017.

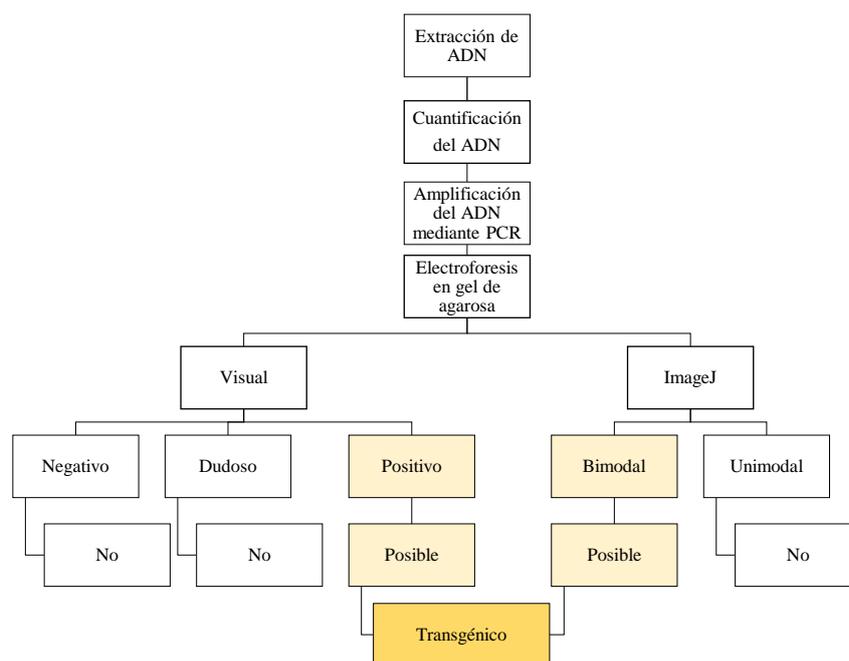


Figura 8. Diagrama de flujo de la metodología de trabajo utilizada durante los análisis de determinación e identificación de transgénesis.

Fuente: Propia

2. Materiales

2.1. Muestras

Para la recolección de tejido de hoja, las plántulas a estudiar de 18 días de edad, fueron cultivadas a partir de granos de maíz comercializados para la elaboración de harina de consumo humano, procedentes de 3 Departamentos de mayor cultivo de este rubro en Paraguay (Aprosemp, 2017): Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú, en el mes de julio del año 2017.

Se recolectaron aleatoriamente 18 muestras de granos de maíz, aproximadamente 500 g de cada muestra. Como controles positivos se utilizaron 2 muestras de granos de maíz GM, proporcionadas por agricultores. Como control negativo de transgenicidad se utilizaron granos de maíz de la Empresa Pioneer 4785, semilla híbrida no transgénica (Pioneer, 2017). Cada muestra (convencional y GM) se colectó por duplicado y se le asignó un código, con el cual se identificaron durante todo el estudio (Tabla 9).

Las muestras de maíces utilizados en el estudio y los lugares de comercialización se muestran en el Anexo 1.

Tabla 9. Código de las muestras utilizadas en el estudio.

Itapúa	Alto Paraná	Canindeyú	Control positivo	Control negativo
i11, i12	a11, a12	c11, c12	SL1, SL2	Pioneer 4785
i21, i22	a21, a22	c21, c22	3P1, 3P2	
i31, i32	a31, a32	c31, c32		
i41, i42	a41, a42	c41, c42		
i51, i52	a51, a52	c51, c52		
i61, i62				
i71, i72				
i81, i82				

Referencias: i = Itapúa; a = Alto Paraná; c = Canindeyú.

Fuente: Propia.

3. Métodos

3.1. Siembra de los granos de maíz

Para la siembra, se utilizaron recipientes plásticos de 700 mL, correctamente rotulados. Los mismos fueron cargados con un tipo de suelo clasificado como oxisol

originario de basalto y 5 g de fertilizante orgánico mineral de formulación 5-17-14, los números indican el porcentaje de macronutrientes esenciales que contiene (Nitrógeno, Fósforo y Potasio), donde los granos de maíz fueron sembrados (Figura 9). El riego se realizó diariamente durante 18 días, con aproximadamente 30 mL de agua para darle una óptima condición de humedad. Las plántulas de maíz a los 18 días de cultivo, se muestran en el Anexo 2.



Figura 9. Siembra de granos comercializados para la elaboración de harina, disponible en los mercados de los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú.

Fuente: Propia.

3.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo CTAB (Abdel Latif and Osman, 2017) modificada por la Universidad de Córdoba, España.

Aproximadamente, 200 mg de hojas jóvenes fueron colocadas en un mortero de porcelana esterilizado para realizar la lisis y con ayuda de nitrógeno líquido se procedió a macerar el material para pulverizarlo. Posteriormente, el material lisado fue colocado en un tubo Eppendorf de 2 mL que contenía 750 μ L de disolución amortiguadora de lisis CTAB (1 M Tris (HCl pH 8.0); 0,5 M EDTA (NaOH pH 8.0); 5 M NaCl; CTAB 2 %), previamente precalentado a 65 ± 2 °C.

Seguidamente, los tubos se incubaron en un termobloque seco a 65 °C durante 30 minutos (a los 15 minutos, los tubos fueron sacados y agitados de 6 a 8 veces). Luego, fueron adicionados 750 μ L de Cloroformo frío (-20 °C), y homogeneizados por inversión. Posteriormente, las mismas fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 8 minutos. El

sobrenadante originado de la centrifugación fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL limpio al que se le agregaron 450 μ L de isopropanol frío (-20 °C) mezclando 6 a 8 veces por inversiones hasta observar las cadenas de ADN.

Luego, las muestras fueron incubadas 5 minutos a temperatura ambiente, y centrifugadas a 8.100 rpm durante 5 minutos. Al finalizar el centrifugado, se notó la formación de la pastilla. Se descartó el isopropanol con cuidado de no perder la pastilla y se lavó con 300 μ L de etanol frío al 70 %. A continuación, las muestras fueron nuevamente centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante fue descartado con cuidado y las pastillas se dejaron secar hasta que todo el solvente se haya evaporado. Por último, se calentó el agua ultra pura a 65 °C y luego se añadieron 30 μ L de este a la pastilla, se dejaron incubar a 37 °C hasta el día siguiente para la disolución completa de la pastilla.

Las concentración de ADN (ng ADN/ μ g de muestra) obtenidas durante la extracción utilizando el método de CTAB modificado se muestran en el Anexo 3.

3.2.1. Verificación de la cantidad y calidad de ADN

La concentración del ADN extraído fue calculada mediante lecturas de absorbancia a 260 nm, en un espectrofotómetro de microvolúmenes, DS-11-DeNovix (Figura 9). La pureza del ácido nucleico se estimaron a partir de la relación de absorbancia a 260 nm /280 nm (Rango Óptimo 1,8 – 2,0). El ADN extraído fue conservado en tubos de 1,5 mL en congelador a -25 °C.

3.3. Detección de transgénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa de punto final

El rastreo de OGM se realizó utilizando la PCR. En este trabajo, fueron escogidas las secuencias transgénicas P-35S-CaMV y T-nos, las mismas se encuentran presentes en más del 95 % de los eventos transgénicos de maíz (Zahradnik *et al.*, 2014). Las construcciones de todos los eventos aprobados en Paraguay hasta la fecha se muestran en el Anexo 4.

Para la detección de estas secuencias se utilizaron como cebadores los pares de P-35S-F/R y T-nos-F/R, que amplifican fragmentos de 161 pb y 130 pb, respectivamente. Las secuencias de los mismos y el tamaño de los amplicones resultantes se muestran en la Tabla

10. Los cebadores fueron seleccionados de acuerdo a estudios previamente publicados (Park, Kim and Kim, 2017).

Tabla 10. Cebadores y sondas utilizadas en la Reacción de la PCR

Blanco	Cebadores	Secuencia (5'- 3')	Tamaño del producto (pb)
P-35S-CaMV	P-35S-F	CGACAGTGGTCCCAAAGATG	161
	P-35S-R	ATATAGAGGAAGGGTCTTGCG	
T-nos	T-nos F	CCTGTTGCCGGTCTTGCGAT	130
	T-nos-R	TGTATAATTGCGGGACTCTAATCA	

Referencias: P-35S-CaMV = promotor de la secuencia promotora 35S del virus del mosaico de la coliflor; T-nos = terminador NOS (nopalina sintasa) de *Agrobacterium tumefaciens*; cebador-F/R= “forward” o “reverse”; C = citosina; G = guanina; A = adenina; T = timina; pb = pares de bases.

Fuente: Development of a screening method for the monitoring of 38 genetically modified maize events in food and feed in South Korea (Park, Kim y Kim, 2017).

La amplificación fue realizada con ADN Taq polimerasa (Doctor protein INC, Corea) en un termociclador (DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler, BIO-RAD). Las condiciones del ciclado fueron: a) Desnaturalización inicial con una duración de 5 minutos a una temperatura de 95 °C; seguido de b) 35 ciclos que incluyeron: desnaturalización de 30 segundos a una temperatura de 95 °C, hibridación de cebadores durante 30 segundos a 60 °C y elongación durante 1 minuto a 72 °C y por último, c) La elongación final fue concretada en un lapso de 10 minutos a 72 °C, llegando a una temperatura final de 4 °C.

Como controles positivos y negativos, fueron aislados ADN de tejido vegetal de dos maíces transgénicos y de un tejido vegetal de maíz híbrido no transgénico.

3.4. Análisis de Datos

El análisis estadístico fue cualitativo. Se realizó un análisis visual de las bandas del gel y se utilizó el programa de imágenes ImageJ 1.38x (National Institutes of Health, EEUU) de uso libre y gratuito (ImageJ, 2017).

Los resultados del análisis visual fueron divididos en 3 categorías, teniendo en cuenta la presencia y/o ausencia de una banda: 1) Positivo, presencia de una banda de mayor intensidad; 2) Dudoso, presencia de una banda de menor intensidad y 3) Negativo, ausencia de banda.

A partir del programa ImageJ, se obtuvieron gráficos de intensidad de las bandas para las muestras aplicadas en cada carril y el área bajo la curva por medio de una integración de cada pico utilizando la herramienta del programa. Los picos bimodales indicaron la presencia de OGM y los picos unimodales la ausencia de los mismos. En la Figura 10 se presentan las intensidades de las bandas obtenidas con este programa para los marcadores y los controles.

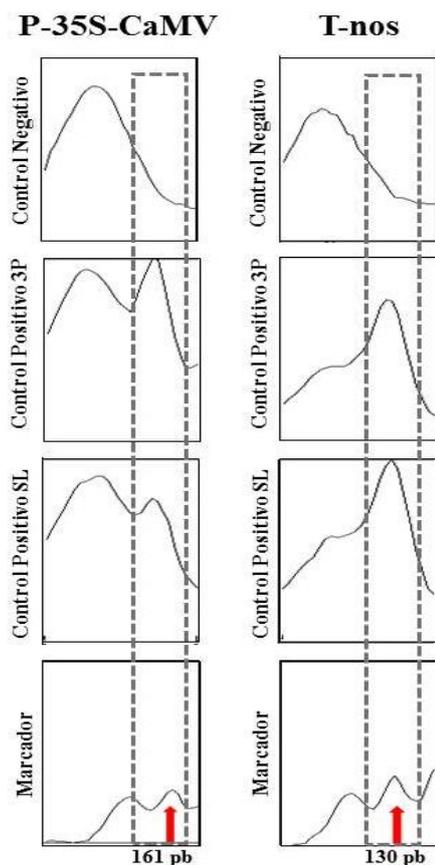


Figura 10. Intensidades de las bandas obtenidas con el programa ImageJ para el marcador y los controles.

Fuente: Propia.

Se observa que tanto en el marcador como en los controles positivos se obtuvieron picos bimodales, por esta razón se consideró como positivo para la presencia de secuencias transgénicas los picos con estas características, y como negativas las muestras que presentaron picos unimodales.

Para la interpretación final de los resultados, se consideraron positivas en el caso de una doble confirmación, es decir, un resultado positivo en el análisis visual y un resultado positivo utilizando el programa ImageJ.

Posteriormente, se analizó la frecuencia de los maíces que presentaron secuencias transgénicas en los diferentes Departamentos estudiados.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Detección de transgénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa de punto final

En este trabajo todas las muestras en estudio se sometieron a amplificación utilizando el método de PCR de punto final con el fin de detectar las secuencias específicas para el promotor P-35S-CaMV y el terminador T-nos, ya que estos elementos de control genético se encuentran presentes en aproximadamente el 95 % de las plantas de maíz GM, actualmente comercializadas en Paraguay (CIISB, 2016).

En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos de las 18 muestras en estudio y de los controles positivos y negativos utilizando el par de cebadores P-35S-F/R.

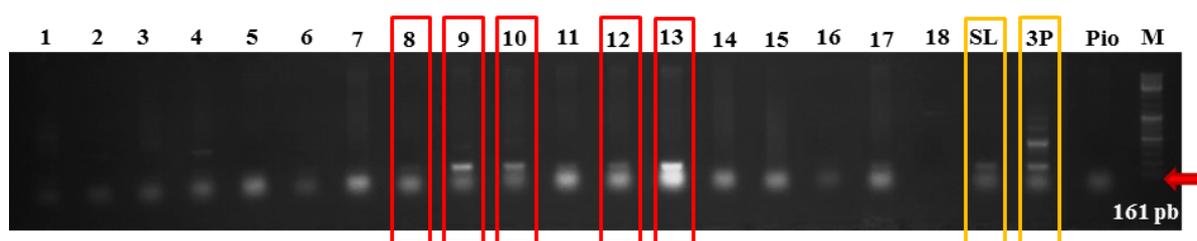


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del promotor P-35S-CaMV.

Referencias: Carril 1 a 18 = muestras de maíz; SL y 3P = controles positivos; Pío = control negativo; M = marcador; 161 pb = tamaño de amplicón esperado para el promotor P-35S-CaMV.

Fuente: Propia.

Se puede apreciar que en los carriles 9, 10, 12, 13 y en los controles positivos, se generaron bandas de gran intensidad y en el carril 8 banda de menor intensidad para el promotor 35S-CaMV con un amplicón observable de aproximadamente 161 pb, lo que sugiere que las muestras de maíces analizadas presentaron contaminación con material transgénico en un 27,78 % (5 de 18 muestras).

En los carriles 1, 3, 4, 5, 6, 11 y 17 que representan al 38,89 % (7 de 18 muestras) los resultados fueron clasificados como dudosos, debido a que las bandas no son nítidas.

Las demás muestras (2, 7, 14, 15, 16 y 18), correspondiente al 33,33 % (6 de 18 muestras), resultaron negativas para este promotor no observándose presencia de bandas.

En la Figura 12 se muestra las intensidades de las bandas obtenidas con el programa ImageJ para la detección del promotor P-35S-CaMV.

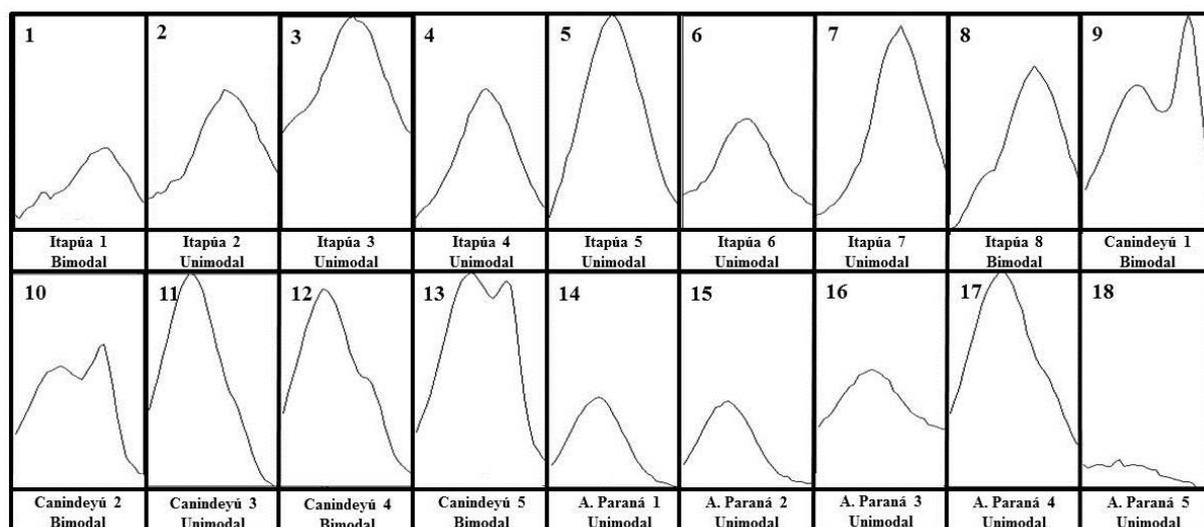


Figura 12. Intensidades de las bandas obtenidas con el programa ImageJ utilizando como marcador 161 pb para la detección del promotor P-35S-CaMV.

Fuente: Propia.

Los resultados indicaron que 6 de las 18 muestras analizadas presentaron picos bimodales, cuyo valor correspondió al 33,33 % del total de las muestras analizadas, siendo estas las muestras 1, 8, 9, 10, 12 y 13. El resto de las muestras presentaron picos unimodales, representando el 66,67 % de las muestras en estudio.

En la Tabla 11 se comparan los resultados del análisis visual y del programa ImageJ, para de esta manera confirmar las muestras dudosas.

Tabla 11. Comparación de los análisis realizados a las amplificaciones obtenidas de la PCR del promotor P-35S-CaMV.

	Muestra	Análisis Visual	ImageJ	Resultado
1	Itapúa 1	Dudoso	Bimodal	Negativo
2	Itapúa 1	Negativo	Unimodal	Negativo
3	Itapúa 1	Dudoso	Unimodal	Negativo
4	Itapúa 1	Dudoso	Unimodal	Negativo
5	Itapúa 1	Dudoso	Unimodal	Negativo
6	Itapúa 1	Dudoso	Unimodal	Negativo
7	Itapúa 1	Negativo	Unimodal	Negativo
8	Itapúa 1	Positivo	Bimodal	Positivo
9	Canindeyú	Positivo	Bimodal	Positivo
10	Canindeyú	Positivo	Bimodal	Positivo
11	Canindeyú	Dudoso	Unimodal	Negativo
12	Canindeyú	Positivo	Bimodal	Positivo
13	Canindeyú	Positivo	Bimodal	Positivo
14	A. Paraná	Negativo	Unimodal	Negativo
15	A. Paraná	Negativo	Unimodal	Negativo
16	A. Paraná	Negativo	Unimodal	Negativo
17	A. Paraná	Dudoso	Unimodal	Negativo
18	A. Paraná	Negativo	Unimodal	Negativo

Fuente: Propia.

Se aprecia que los resultados fueron coincidentes por ambos análisis en cinco muestras (8, 9, 10, 12 y 13) que resultaron positivas y seis muestras (2, 7, 14, 15, 16 y 18) que resultaron negativas, para ambos casos. Asimismo, se observó discrepancia entre siete muestras, donde la muestra 1 fue dudosa en el análisis visual y utilizando el programa se observó un pico bimodal no muy acentuado; de igual manera, las muestras 3, 4, 5, 6, 11 y 17 fueron dudosas en el análisis visual, no obstante, en el gráfico de intensidad de bandas se generó picos unimodales; debido a esta discrepancia estas muestras se consideraron como negativas.

Los hallazgos de esta investigación para el promotor P-35S-CaMV coinciden con otros autores que han reportado presencia de los mismos en muestras de maíz comercialmente disponible en los mercados de varios países. Es así que, en la investigación realizada por Rabiei *et al.* (2013) en Irán, donde estudiaron muestras de granos de maíz y alimentos altamente procesados derivados de maíz, se demostró que 5 de 25 muestras analizadas

resultaron ser positivas para los cebadores P-35S-F y P-35S-R, confirmando la presencia del 20 % de OGM. Otro estudio realizado en harinas de maíz tipo polenta en Uruguay por Fernández Campos *et al.* (2012), evidenciaron que el 100 % de las muestras estudiadas resultaron positivas para el promotor P-35S-CaMV, discrepando con nuestros hallazgos ya que encontramos solamente este promotor en el 33,33% de las muestras.

En cuanto a los resultados obtenidos para el terminador T-nos, en la Figura 13 se presenta las bandas que arrojó la electroforesis del gel de agarosa.

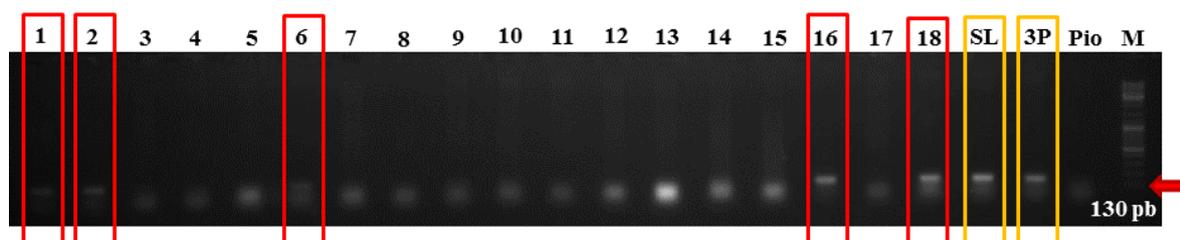


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del T-nos.

Referencias: Carril 1 a 18 = muestras de maíz; SL y 3P = control positivo; Pio = control negativo; M = marcador; 130 pb = tamaño de amplicón esperado para el terminador T-nos.

Fuente: Propia.

De acuerdo al análisis visual, las bandas de mayor intensidad fueron consideradas como positivas, siendo ellas las que se presentan en los carriles 1, 2, 6, 16 y 18, que representan al 27,78 % de las muestras, lo que indica la presencia del T-nos en las muestras analizadas.

De la misma manera, el 27,78 % de las muestras fueron clasificadas como dudosas, debido a que presentaron bandas de menor intensidad, estas fueron las muestras 3, 4, 9, 10 y 14.

Por otro lado, en el 44,44 % de las muestras no se visualizaron productos de amplificación, estas correspondieron a las muestras 5, 7, 8, 11, 12, 13, 15 y 17.

En la Figura 14 se presentan los gráficos de la intensidad de las bandas generadas por el programa ImageJ para el terminador T-nos.

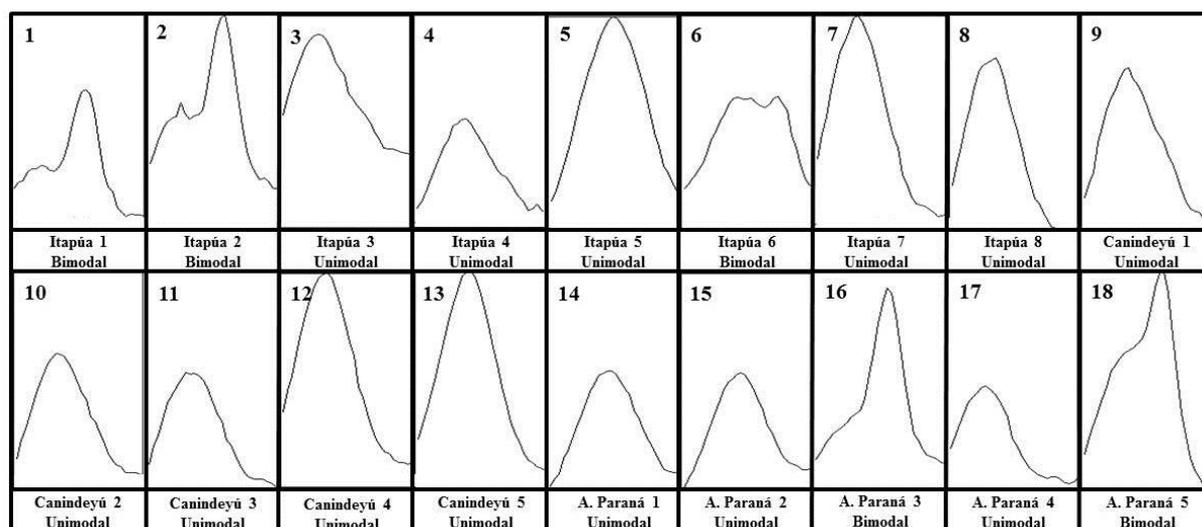


Figura 14. Intensidad de las bandas obtenidas con el programa ImageJ utilizando como marcador 130 pb para la detección del terminador T-nos.

Fuente: Propia.

Se puede observar que las muestras 1, 2, 6, 16 y 18 presentaron picos bimodales, que representan al 27,78 % de las muestras de maíz, indicando un resultado positivo para el terminador T-nos. Las demás muestras resultaron negativas para este terminador, correspondiente al 72,22 % de las muestras de maíz analizadas.

En la Tabla 12 se puede observar una comparación de los análisis utilizados para la interpretación de las amplificaciones del T-nos.

Tabla 12. Comparación de los análisis realizados a las amplificaciones obtenidas de la PCR del terminador T-nos.

	Muestra	Análisis Visual	ImageJ	Resultado
1	Itapúa 1	Positivo	Bimodal	Positivo
2	Itapúa 1	Positivo	Bimodal	Positivo
3	Itapúa 1	Dudoso	Unimodal	Negativo
4	Itapúa 1	Dudoso	Unimodal	Negativo
5	Itapúa 1	Negativo	Unimodal	Negativo
6	Itapúa 1	Positivo	Bimodal	Positivo
7	Itapúa 1	Negativo	Unimodal	Negativo
8	Itapúa 1	Negativo	Unimodal	Negativo
9	Canindeyú	Dudoso	Unimodal	Negativo
10	Canindeyú	Dudoso	Unimodal	Negativo
11	Canindeyú	Negativo	Unimodal	Negativo
12	Canindeyú	Negativo	Unimodal	Negativo
13	Canindeyú	Negativo	Unimodal	Negativo
14	A. Paraná	Dudoso	Unimodal	Negativo
15	A. Paraná	Negativo	Unimodal	Negativo
16	A. Paraná	Positivo	Bimodal	Positivo
17	A. Paraná	Negativo	Unimodal	Negativo
18	A. Paraná	Positivo	Bimodal	Positivo

Fuente: Propia.

Se puede divisar que ambos análisis concuerdan en 13 muestras, de las cuales 5 muestras (1, 2, 6, 16 y 18) resultaron positivas y ocho muestras (5, 7, 8, 11, 12, 13, 15 y 17) resultaron negativas, para ambos casos. También se vieron casos en los que los análisis no coincidieron: las muestras 3, 4, 9, 10 y 14 fueron dudosas en el análisis visual, sin embargo, el programa ImageJ arrojó un pico unimodal, por tanto se consideran como muestras negativas.

La comparación del análisis visual de PCR con el análisis usando el programa ImageJ mostró tendencias similares en la detección de OGM. En la Tabla 13 se presentan los datos generados luego de la comparación de los dos tipos de análisis realizados para la interpretación de la electroforesis del gel de agarosa.

Tabla 13. Resumen de los dos tipos de análisis para la interpretación de la electroforesis del gel de agarosa.

M	P-35S-CaMV	T-nos	Resultado
1	Negativo	Positivo	Positivo
2	Negativo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Positivo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Negativo	Positivo
9	Positivo	Negativo	Positivo
10	Positivo	Negativo	Positivo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Positivo	Negativo	Positivo
13	Positivo	Negativo	Positivo
14	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo
16	Negativo	Positivo	Positivo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Positivo	Positivo

Fuente: Propia.

Se observó que 10 muestras presentaron contaminación con las secuencias transgénicas estudiadas, correspondiente al 55,56 % del total de las muestras analizadas, en las condiciones ensayadas. Las muestras 8, 9, 10, 12 y 13 resultaron positivas para el promotor P-35S-CaMV y las muestras 1,2, 6, 16 y 18 fueron positivas para el terminador T-nos. Ninguna de las muestras presentaron tanto el promotor como el terminador en su construcción.

Cabe destacar que, las muestras que resultaron negativas, no necesariamente carecen de material GM, debido a que, para realizar el rastreo de OGMs se evaluaron únicamente el promotor 35S y el terminador T-nos. Todos los eventos de maíz que utilizan diferentes promotores y terminadores en su construcción, quedaron fuera del análisis. Es importante recalcar que en las muestras que no presentaron resultados positivos para T-nos, pero si para la región P-35S-CaMV o viceversa, podrían tener en su construcción eventos transgénicos

que posean solamente el promotor (MON810, TC1507, MON810xTC1507) o terminador (GA21, MIR162, MIR162xGA21) (CIIISB, 2016).

Actualmente todos los eventos aprobados en Paraguay contienen en su construcción el promotor y terminador utilizados en este estudio, pero no se puede descartar la posibilidad de que estos maíces estén contaminados con eventos que están aprobados en los países vecinos como Argentina y Brasil.

En la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos en este trabajo en porcentaje de las muestras de maíz contaminados con OGM distribuidos por Departamentos.

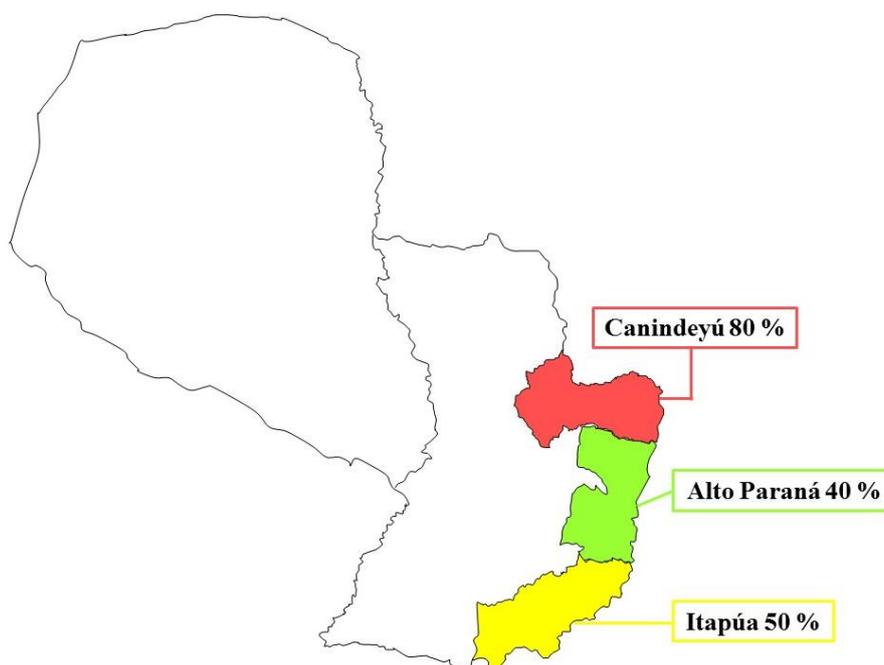


Figura 15. Porcentaje de Transgénicos por Departamento.

Referencia: n = número de muestras; n = 8 Itapúa; n = 5 Alto Paraná; n = 5 Canindeyú.

Fuente: Propia.

Para el Departamento de Itapúa, de las 8 muestras analizadas, 4 de ellas presentaron secuencias nucleótidas del promotor P-35S-CaMV y/o terminador T-nos, esto corresponde al 50 % de las muestras que se utilizaron para este estudio.

En cuanto al Departamento de Alto Paraná, de las 5 muestras analizadas, 2 muestras contuvieron niveles detectables de secuencias GM, correspondiente al 40 %.

Por otra parte, para el Departamento de Canindeyú, de las 5 muestras estudiadas, en 4 de ellas se observó la presencia de secuencias transgénicas detectables, equivalente al 80 %.

De igual forma, en otros países, varios autores han reportado la presencia de las mismas secuencias transgénicas utilizadas en esta investigación para la detección de OGM en maíz. En Costa Rica, para la búsqueda de transgénicos en alimentos procesados cuyo ingrediente principal se basaba en maíz y soya, Carvajal *et al.* (2017) analizaron 36 muestras de alimentos sólidos, donde los resultados revelaron que el 86 % contenían el promotor P-35S-CaMV y el 72 % el terminador T-nos, siendo que el 29 % de las muestras fueron productos a base de maíz. Asimismo, en Portugal, Fernandes *et al.* (2014) analizaron la presencia del promotor P-35S-CaMV y del terminador T-nos utilizando la técnica de PCR en 119 muestras de grano de maíz, harina de maíz, entre otros productos; los resultados evidenciaron que el 30 % fueron positivo para el promotor y el 10 % para el terminador.

Mendoza *et al.* (2009) evaluaron la presencia de OGM en productos alimenticios procesados derivados de maíz y soya (tortilla, totopos y aceites comestibles) empleando oligonucleótidos específicos del promotor 35S, terminador T-nos y además de genes específicos de zeína y lectina para la identificación del producto. Coincidiendo con este trabajo, la presencia del promotor 35S indicó que estaban contaminadas con material transgénico.

Al igual que en este trabajo, en una investigación realizada en Brasil, se evaluó la presencia del promotor P-35S, el terminador T-nos y el gen Cry en 12 muestras de maíces GM de productos industrialmente procesados, granos secos y mazorcas de maíz comercializado para consumo en fresco. Los resultados demostraron que, solo 5 de las muestras de harinas de maíz presentaban las especificaciones correctas en su etiqueta, indicando que es un producto a base de maíz transgénico; por otro lado, casi el 90% de las mazorcas fueron positivas para al menos un objetivo GM buscado, lo que demuestra el gran uso de cultivares genéticamente modificados para producir mazorcas comerciales para el consumo humano (Oliveira *et al.*, 2016).

Premanandh *et al.* (2012) en un estudio realizado en muestras que consistían en productos de maíz, soja, trigo, arroz y pizza; importadas de EE. UU., Reino Unido, UE, Brasil, Sudáfrica, India, Tailandia, Filipinas, Egipto y China, en donde se determinó el estado de los alimentos GM en el mercado de los Emiratos Árabes Unidos (EAU) utilizando la PCR en tiempo real, Lightcycler y el kit de detección de OGM (35S, Tnos, Lectina y Zeína). De las

128 muestras analizadas, 18 fueron positivas para el promotor 35S y 20 para el terminador T-nos, coincidiendo con los resultados de este estudio.

Por otra parte, para la detección de contaminación de la materia prima para la elaboración de queso de cabra en Montevideo, Uruguay (Correa, 2013) evaluó 7 muestras de queso cuyo espesante fue harina a base de maíz, los resultados fueron similar a esta investigación, en donde 5 muestras resultaron positivas para el promotor P-35S-CaMV, del mismo modo, también se detectó la presencia de 3 muestras positivas y 2 resultaron dudosas para el terminador T-nos, de esta manera, se evidenció que las muestras de quesos se encontraban contaminadas con harina de maíz de origen transgénico. Similarmente, Meriç *et al.* (2014) analizaron 11 tipos de alimentos obtenidos de diferentes regiones de Turquía para la detección de OGM utilizando la técnica de PCR convencional, empleando el promotor 35S-CaMV y el terminador T-nos y posteriormente se analizaron si las muestras contenían el evento Bt176. Todas las muestras fueron positivas para ambos cebadores estudiados, sin embargo no se detectó el evento Bt176.

De igual modo, en Perú se determinó la presencia de OGM utilizando también el mismo promotor y terminador estudiado en este trabajo, y en algunos casos, la detección del gen pat y eventos específicos como el MON810 y NK603, utilizando la técnica de PCR en tiempo real y ensayos inmunológicos. Las muestras evaluadas fueron recogidas de los transportes de carga de los cultivares de maíz que suponían que no se encontraban contaminadas con transgenes. Se evidenció que, los objetivos encontrados con mayor frecuencia fueron el promotor P-35S-CaMV, el terminador T-nos y el evento MON810 (Santa Maria, Lajo Morgan and Guardia, 2014). En investigaciones similares realizadas en 74 alimentos procesados a bases de maíz provenientes de Estados Unidos, China, Corea y Japón, se observaron que 18 de ellos contenían uno o más eventos específicos de maíz transgénico, entre ellos el MON810, GA21 y el NK603 (Kim, Zhang and Kim, 2014).

Park, Kim y Kim (2017) desarrollaron un sistema de PCR múltiple para rastrear eventos de maíz transgénicos en alimentos y piensos de 22 muestras de alimentos que contenían maíz como ingrediente y 36 granos de maíz. Seleccionaron 10 objetivos para el rastreo: promotor 35S, gen rAct1, terminador 35S, t-nos, PinII, hsp17, cry1A, bar, pat, cp4-epsps. Estos objetivos de detección se combinaron en tres ensayos individuales de PCR múltiple. La especificidad del método se confirmó mediante la detección de la amplificación específica del ADN derivado de 16 diferentes eventos de maíz GM. Se encontraron varios tipos de eventos GM individuales y/o apilados en 11 muestras de alimentos y 20 de granos de

maíz. Estos resultados demuestran que el método de detección desarrollado puede ser útil para rastrear eventos de maíz transgénico en alimentos y piensos.

Como se ha mencionado anteriormente, el maíz es un cultivo de polinización cruzada que depende del viento para la dispersión de su polen, pudiendo existir una mezcla accidental entre material GM y no GM. Las fuentes potenciales son el flujo natural entre campos vecinos, el uso de semillas impuras, aparición de plantas voluntarias procedentes de semillas y/o partes vegetativas de plantas anteriores, entre otras (Devos *et al.*, 2002), por lo que la estructura genética de una variedad muchas veces no es estable (Hernández Ramos *et al.*, 2017). La presencia accidental de OGM en México, se ha reportado por Quist y Chapela (2001) y Piñeyro Nelson *et al.* (2009) como consecuencia de la polinización cruzada en cultivos maíces nativos.

En Colombia en el 2010 Chaparro Giraldo, Blanco y Lopez Pazos (2015) analizaron el fenómeno de flujo de genes en 60 parcelas de maíz, utilizando 3 métodos de detección: Inmunostrip®, PCR y ELISA sobre muestras de hojas (flujo de genes vía semilla) y semillas (flujo de genes vía polen). El 88 % de las parcelas fueron positivas para las pruebas de Inmunostrip® y PCR (para identificación del promotor 35S, terminador T-nos y gene cry1F) sobre hojas, mientras que el 12% de las parcelas restantes fueron positivas para transgenes en semillas. Los resultados mostraron un nivel importante de presencia de secuencias transgénicas consistente en flujo de genes. Todos los tipos de campos (maíz convencional, zonas de amortiguamiento, de refugio y zonas con variedades locales colombianas) mostraron presencia de transgenes. Esto se debe a algunos problemas identificados, como poco respeto por la normativa legal sobre cultivos transgénicos y bioseguridad, la falta de conservación de la distancia entre el maíz GM y no GM o el uso de zonas de refugio y/o amortiguamiento y escasa asistencia técnica.

Para la evaluación de la frecuencia de la presencia de transgenes en las progenies de los cultivos no GM que se encuentran cercanos a los cultivos GM, en Uruguay, Arleo (2015) empleó técnicas moleculares de detección de OGM, donde los resultados mostraron la existencia de contaminación transgénica en cultivos convencionales vecinos a OGM cuya distancia fueron de hasta 420 m. Se ha demostrado que el polen de maíz puede viajar a distancias mayores a 800 m. Dependiendo de las circunstancias climáticas, resulta importante poner a punto metodologías que permitan detectar la contaminación cruzada en conjunto con políticas de controles estrictos de distancias de amortiguación para asegurar la coexistencia de cultivos GM y no GM (Devos, Reheul and De Schrijver, 2005).

En el estudio realizado por Nascimento *et al.* (2012) en Brasil, se evaluó el flujo génico entre maíz GM y no GM. Las muestras fueron recolectadas de los cultivos de maíz convencionales, a partir de 5 m de distancia de la fuente con el maíz transgénico. Los análisis de flujo génico se realizaron por medio de la técnica de PCR en tiempo real. Los resultados arrojaron que la fecundación cruzada ocurrió en un 82 % de los primeros 30 m. Hasta distancias de 50 m ocurrieron una fecundación por arriba del 10 %. En la distancia de 100 metros ocurrió fecundación inferior al 1%. El aislamiento de 20 m, con 10 hileras de refugio, no es suficiente para garantizar tasas de fecundación cruzada inferior al 1%.

Una de las preocupaciones que surge a partir de la liberación del maíz transgénico al ambiente es la conservación de las razas nativas/criollas y la distancia necesaria para evitar la polinización cruzada (Vives Vallés *et al.*, 2015). En el año 2010, en Estados Unidos, para atenuar la amenaza de resistencia a los insectos, los productores de maíz BT han impuesto una estrategia, que consiste en una mezcla de semillas de 5 % semilla no BT y 95 % de semilla BT, no obstante, existe una preocupación por el cumplimiento de dichos refugios debido a la posibilidad de que ocurra polinización cruzada de híbridos de maíz que pueden inducir a la presencia de proteínas BT en los granos y que estos afecten negativamente en la supervivencia, crecimiento y desarrollo de los insectos refugiados (Yang *et al.*, 2014). En Paraguay, el refugio recomendado depende de la superficie sembrada, es recomendable que sea del 5 %, 10 % y 20 % de semillas no GM (Senave, 2017); no se conoce el grado de interpolinización entre maíces transgénicos y no transgénicos y, por lo tanto, el grado de contaminación con transgénicos, este aspecto es de interés para la conservación *in situ* de recursos genéticos locales.

En una investigación realizada por Galeano *et al.* (2010), se evaluó la ocurrencia y la frecuencia de la fertilización cruzada entre cultivos GM y no GM comercializados en Uruguay. Se seleccionaron cinco campos donde se cultivaron maíz no GM cerca de cultivos GM (campos con potencial de fertilización cruzada). Se encontró la presencia de material GM, de los eventos MON810 y Bt11 en tres de los cinco casos. Los porcentajes de plántulas transgénicas en la descendencia de los cultivos no modificados genéticamente se estimaron entre 0,56 %, 0,83 % y 0,13 % para los tres sitios de muestreo contaminados que se encontraban entre 40, 100 y 330 m de distancia, respectivamente de los cultivos modificados genéticamente.

Por otra parte, el trabajo realizado en el estado de Sinaloa México en el año 2010, en donde el objetivo del estudio fue analizar de forma espacial la dispersión del polen de maíz

GM utilizando datos históricos de liberaciones autorizadas de maíces GM y datos de floración, velocidad y dirección del viento, temperatura y humedad relativa del aire usando el modelo de simulación HYSPLIT (*Hybrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory*) para el desarrollo de simulaciones progresivas de dispersión considerandos un tiempo de viabilidad de las partículas de 2 horas. El análisis de los resultados mostró que las partículas de polen pueden recorrer distancias mayores a 300 y 500 m asumidos como medidas de bioseguridad (Robayo Avendaño and Galindo Mendoza, 2014).

Han pasado muchos años de la introducción de los transgénicos en la agricultura, pero existen interrogantes acerca de los efectos potenciales que este tipo de tecnología puede generar sobre la diversidad genética de los cultivos y sobre la seguridad alimentaria (Shao et al., 2014). Se necesitan patrones de seguridad apropiados para permitir el avance tecnológico y preservar la salud pública y el medio ambiente. Esto se refleja en la ratificación de más de 80 países del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, que regula el movimiento transfronterizo, el tránsito, la manipulación y el uso de organismos vivos modificados (Pertry et al., 2014).

En una investigación realizada por Turkec, Lucas y Karlik (2016) seleccionaron alimentos y productos alimenticios que contenían maíz de Turquía para evaluar la prevalencia del material transgénico, se examinaron 83 alimentos y productos alimenticios, ninguno etiquetado como que contenía material GM, utilizando la PCR en tiempo real para cuatro elementos GM comunes (35S/NOS/bar/FMV). De estos, el 18, 2 % de los alimentos y el 6 % de las muestras de alimentos arrojaron resultados positivos para uno o más de estos elementos, y fueron sometidos a PCR específica de eventos para identificar qué OGM contenían. La mayoría de las muestras fueron negativas para los eventos aprobados de GM, lo que sugirieron que podrían contener contaminantes GM adventicios. Se mostró que una muestra contenía un evento GM no aprobado (MON810 junto con GA21) en una concentración muy superior al requisito de etiquetado legal. La legislación actual ha restringido la penetración del maíz GM en la industria alimenticia turca, pero no la ha eliminado, y la proliferación de diferentes eventos GM está haciendo que el monitoreo sea cada vez más complejo. Sus resultados indican que los requisitos de etiquetado no se siguen en algunos casos.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de secuencias transgénicas en el 55,56% de las muestras; siendo que en el 27,78% se evidenciaron la presencia del promotor P-35S-CaMV, asimismo, la presencia del terminador T-nos correspondió al 27,78 %.

Los hallazgos en este estudio sugieren que muchos de los alimentos consumidos diariamente por los paraguayos presentan secuencias derivadas de OGMs.

Se sugiere la implementación de sistemas de etiquetados para productos alimenticios GM. Se plantea mejorar la estrategia de refugio para reducir la contaminación de las semillas por el flujo de genes de plantas transgénicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel Latif, A. and Osman, G. (2017) ‘Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize’, *Plant Methods*. BioMed Central, 13(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4.

Acosta, R. (2009) ‘El cultivo del maíz, SU origen y clasificación. EL MAIZ en Cuba’, *Cultivos Tropicales*, 30(2), pp. 113–120. doi: 10.1007/s13199-013-0250-2.

Alvarez, A. (2006) ‘Aplicaciones del maíz en la tecnología alimentaria y otras industrias’, *ILSI*, II, pp. 9–13.

Aprosemp (2017) ‘Aprosemp’, *Asociación de Productores de Semillas del Paraguay*. Available at: <http://www.aprosemp.org.py/uploads/stats/maiz.pdf> (Accessed: 11 January 2018).

Arleo, M. (2015) *Detección y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados en cultivos de maíz y alimentos derivados , mediante análisis molecular*.

Baktavachalam, G. B. *et al.* (2015) ‘Transgenic maize event TC1507: Global status of food, feed, and environmental safety’, *GM Crops & Food*, 6(2), pp. 80–102. doi: 10.1080/21645698.2015.1054093.

Baltazar, B. M. *et al.* (2015) ‘Pollen-mediated gene flow in maize: Implications for isolation requirements and coexistence in Mexico, the center of origin of maize’, *PLoS ONE*, 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0131549.

Base Investigaciones Sociales (2016) *El proyecto de ley de etiquetado de transgénicos entró hoy oficialmente al Senado | baseis.org.py*. Available at: <http://www.baseis.org.py/el-proyecto-de-ley-de-etiquetado-de-tansgenicos-entro-hoy-oficialmente-al-senado/> (Accessed: 9 January 2018).

Blanco Valdes, Y., Durañona, H. and Acosta Roca, R. (2016) ‘Efecto de la Temperatura y la humedad en la conservación de los granos de maíz en silos metálicos refrigerados’, *Cultivos Tropicales*, 37(4), pp. 105–114. doi: 10.13140/RG.2.2.13900.21127.

CAPECO (2016) *Área de Siembra, Producción y Rendimiento*. Available at: <http://capeco.org.py/area-de-siembra-produccion-y-rendimiento/> (Accessed: 2 June 2017).

Carreño-Venegas, A. and Chaparro-giraldo, A. (2016) ‘Diseño de casetes de expresión que confieran tolerancia a sequía y a glufosinato en maíz (*Zea mays*)’, *Acta Biológica*

Colombiana, 21(3), pp. 555–570. doi: 10.15446/abc.v21n3.51170.

Carvajal, P. *et al.* (2017) ‘Detección molecular de secuencias de ADN Transgénico en alimentos de consumo humano y animal en Costa Rica’, *Agronomía Costarricense*, 41(1), pp. 53–68. doi: 10.15517/rac.v41i1.29751.

cera (2016) *BT11 (X4334CBR , X4734CBR) (SYN-BTØ11-1)*. Available at: Cera-gmc.org.

Cera (2014) *GA21 (MON-ØØØ21-9)*. Available at: cera-gmc.org.

Cera (2015) ‘BT11 (X4334CBR , X4734CBR) (SYN-BTØ11-1)’, 11.

Cera GM crop database (2014) *GA21 (MON-ØØØ21-9)*.

Chaparro Giraldo, A., Blanco, J. T. and Lopez Pazos, S. A. (2015) ‘Evidencia de flujo de genes entre maíces transgénicos y no transgénicos in Colombia’, *Agronomía Colombiana*, 33(3), pp. 297–304. doi: 10.15446/agron.colomb.v33n3.51505.

Chilcutt, C. F. and Tabashnik, B. E. (2004) ‘Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), pp. 7526–9. doi: 10.1073/pnas.0400546101.

CIISB (2016) *Búsqueda de OVM, genes u organismos*. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Available at: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14776> (Accessed: 8 February 2018).

CIISB (2017) ‘Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología’. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Available at: <http://bch.cbd.int/default.shtml> (Accessed: 13 July 2017).

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) (2017) *Razas de maíz en Mexico*. Available at: <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/maices/razas2012.html> (Accessed: 18 January 2018).

Corona, B., Uffo, O. and Martínez, S. (2006) ‘Detección de organismos genéticamente modificados (OGMs) en la cadena alimentaria’, *Revista de(2)*, pp. 69–78. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=43235767&lang=es&site=ehost-live>.

Correa, J. (2013) ‘Detección de leche bovina y maíz genéticamente modificado en

Quesos de Cabra’.

Cottenet, G. *et al.* (2013) ‘Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), pp. 6831–6844. doi: 10.1007/s00216-013-7125-5.

Devos, Y., Reheul, D. and De Schrijver, A. (2002) ‘The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization’, *Environmental biosafety research*, 1(1), pp. 49–60. doi: 10.1051/ebr.

Devos, Y., Reheul, D. and De Schrijver, A. (2005) ‘The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and’, *Environmental biosafety research*, 1(1), pp. 71–87. doi: 10.1051/ebr.

Eugster, A. *et al.* (2014) ‘Development and Validation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV Tetraplex Real-time PCR Screening Method to Detect Regulatory Genes of Genetically Modified Organisms in Food’, *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 68(10), pp. 701–704. doi: 10.2533/chimia.2014.701.

European Commission (2016) *GMOMETHODS, EU Database of Reference Methods for GMO Analysis*.

FAO (2017) ‘EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción’, *Fao*, p. 392. doi: Deposito de Documentos de la FAO.

Fernandes, T. J. R. *et al.* (2014) ‘A survey on genetically modified maize in foods commercialised in Portugal’, *Food Control*. Elsevier Ltd, 35(1), pp. 338–344. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.017.

Fernández Campos, M. (2012) *Análisis de Transgénesis mediante PCR de 20 Polentas que se encuentran a la venta en el Mercado Uruguayo*. Universidad de la República.

Fernandez Campos, M., Da Silva, A. and Martínez Debat, C. (2012) ‘Análisis de transgénesis mediante PCR de 20 harinas de maíz (polentas) que se encuentran a la venta en el mercado uruguayo’, *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(1), pp. 92–104.

Fernández Ríos, D., Rubinstein, C. and Vicién, C. (2018) ‘Capacities for the Risk Assessment of GMOs: Challenges to Build Sustainable Systems’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(April), p. 40. doi: 10.3389/FBIOE.2018.00040.

Fraiture, M. A. *et al.* (2015) 'Review Article Current and New Approaches in GMO Detection : Challenges and Solutions', *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–22. doi: 10.1155/2015/392872.

Furgal-Dierzuk, I. *et al.* (2014) 'The effect of genetically modified maize (MON 810) and soyabean meal (Roundup Ready) on rearing performance and transfer of transgenic DNA to calf tissues', *Journal of Animal and Feed Sciences*, 23(Mon 810), pp. 13–22.

Galeano, P. *et al.* (2010) *Interpolinización entre cultivos de maíz transgénico y no transgénico comerciales en Uruguay.*

García Flores, M. *et al.* (2015) 'Contenido de carotenoides del grano de maíz híbrido cultivado en invernadero.', *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 3, pp. 1–9.

García Hernández, J. E. (2016) *José elmer garcía hernández.* Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Agronomía.

Gomez, V. A. *et al.* (2017) 'Toxicidad sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) de la proteína Bt expresada en hojas de diferentes eventos de maíz transgénicos liberados en Paraguay', *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 76(1–2), pp. 1–10.

Grande Tovar, C. D. and Orozco Colonia, B. S. (2013) 'Producción y procesamiento del maíz en Colombia', *Revista Científica Guillermo de Ocklam*, 11(1), pp. 97–110.

Gutierrez Angoa, L. *et al.* (2015) 'Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qPCR y dPCR', *Agrociencia*, pp. 373–394.

Hansey, C. N. *et al.* (2012) 'Maize (*zea mays* L.) genome diversity as revealed by rna-sequencing', *PLoS ONE*, 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0033071.

Hernández Juárez, A. (2012) *Efectividad Biológica del maíz genéticamente modificado para el control de pelidópteros y su efecto sobre la diversidad de artrópodos no blanco.*

Hernández Ramos, M. A. *et al.* (2017) 'Caracterización molecular de maíces locales de la Reserva de la Biosfera La Sepultura, México.', *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), pp. 69–83. doi: 10.15517/am.v28i1.21612.

Hernández Ramos, M. A., Rodríguez Larramendi, L. A. and Guevara Hernández, F. (2017) 'Caracterización molecular de maíces locales de la Biosfera La Sepultura, México',

Agronomia Mesoamericana, 28(1), pp. 69–83. doi: 10.15517/am.v28i1.21612.

Holst Jensen, A. *et al.* (2012) ‘Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials’, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 30(6), pp. 1318–1335. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.024.

Huang, X. *et al.* (2014) ‘Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method’, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 156, pp. 184–189. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.102.

ImageJ (2017) *ImageJ*. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/> (Accessed: 9 January 2018).

Intriago Barrero, R. and Bravo Velásquez, E. (2015) ‘Situación actual del Ecuador como territorio libre de transgénicos’, *Letras Verdes. Revista Latinoamericana de estudios socioambientales*, (18), pp. 264–275. doi: 10.17141/letrasverdes.18.2015.1606.

ISAAA (2016) *Pocket K No. 16 - Biotech Crop Highlights in 2015, ISAAA Website*. Available at: <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/>.

James, C. (2016) *ISAAA Briefs brief. Global status of Commercialized biotech / GM Crops : 2016, ISAAA Briefs*. doi: 10.1017/S0014479706343797.

Kamle, S. and Ali, S. (2013) ‘Genetically modified crops: Detection strategies and biosafety issues’, *Gene*. Elsevier B.V., 522(2), pp. 123–132. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.107.

Kim, J. H., Zhang, D. and Kim, H. Y. (2014) ‘Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems’, *Food Control*. Elsevier Ltd, 35(1), pp. 345–353. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.029.

Loriths, N. *et al.* (2017) ‘Consumo y regulación de alimentos transgénicos contaminados con Glifosato Consumption and regulation of transgenic foods contaminated with Glyphosate and its impact on health’, 15(1), pp. 35–39.

MAG (2008) ‘Informe Nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. Segundo Informe’, p. 103.

MAG (2012a) *Decreto N° 9699. Resolución de creación de la CONBIO*. Available at: [http://www.mag.gov.py:222/media/ckfinder/files/Decreto 9699.pdf](http://www.mag.gov.py:222/media/ckfinder/files/Decreto%209699.pdf) (Accessed: 13 June 2017).

MAG (2012b) ‘Resolución N° 888 Se autoriza a la Empresa Monsanto Paraguay S.A la liberación comercial del maíz conteniendo el evento MON 810’. Available at:

<http://www.mag.gov.py:222/media/ckfinder/files/Resolucion N 888.pdf>.

Mandaci, M. *et al.* (2015) 'Detection of genetically modified organisms in soy products sold in Turkish market', *Food Science and Technology*, 34(4), pp. 717–722. doi: 10.1590/1678-457X.6441.

Manzur, M. I. and Cárcamo, M. I. (2014) *América Latina: La transgénesis de un continente. Visión crítica de una expansión descontrolada*.

Mas, E. *et al.* (2016) 'Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)', *Revista AquaTIC*, 0(15). Available at: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139/128>.

Megna Francisco, P. R., Santos, D. and Rodrigues Viana de Lima, E. (2016) 'Mapeamento do potencial pedoclimático da cultura do milho (zea mays l.) para o estado da Paraíba utilizando geotecnologias', *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada*, 10(6), pp. 1023–1037. doi: 10.7127/rbai.v10n600482.

Méndez Barceló, A. and González Parra, Y. M. (2014) 'Plagas asociadas al cultivo del maíz (Zea mays L .) en un área del estado Aragua , Venezuela', *Fitosanidad*, 18(3), pp. 175–179.

Mendoza, A. *et al.* (2009) 'Detection of Genetically Modified Maize Food Products By the Polymerase Chain Reaction', *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 5(3), pp. 175–181. doi: 10.1080/11358120609487689.

Meriç, S. *et al.* (2014) 'Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples', *Genetics and Molecular Research*, 13(1), pp. 1160–1168. doi: 10.4238/2014.February.25.2.

Messeguer, J. *et al.* (2006) 'Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence', *Plant Biotechnology Journal*, 4(6), pp. 633–645. doi: 10.1111/j.1467-7652.2006.00207.x.

Milavec, M. *et al.* (2014) 'GMO quantification: Valuable experience and insights for the future', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(26), pp. 6485–6497. doi: 10.1007/s00216-014-8077-0.

Montesinos López, O. A. *et al.* (2013) 'Tamaño de muestra para estimar expresión genética de plantas transgénicas usando pruebas de grupo', 4(1), pp. 33–47.

Nascimento, V. E. *et al.* (2012) ‘Fluxo gênico em milho geneticamente modificado com resistência a insetos’, *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 47(6), pp. 784–790. doi: 10.1590/S0100-204X2012000600008.

Nicolia, A. *et al.* (2013) ‘An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research’, *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(1), pp. 77–88. doi: 10.3109/07388551.2013.823595.

Noldin, O. and Machado, V. (2007) ‘Evaluación preliminar de la variabilidad de razas tradicionales de maiz (*zea mays* l.) en Paraguay’, *Procisur*, pp. 189–194. Available at: <http://www.procisur.org.uy/adjuntos/plataforma-regional/145050.pdf#page=145>.

OECD (2003) ‘Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize) Environment’, (34), pp. 1–49. Available at: [http://www.oecd.org/biotrack/%5Cn\(http://www.oecd.org/ehs/](http://www.oecd.org/biotrack/%5Cn(http://www.oecd.org/ehs/)

Oliveira, C. A. M. *et al.* (2016) ‘Detection of genetically modified maize in processed products, dry grains, and corn ears intended for fresh consumption in South Brazil’, *Genetics and Molecular Research*, 15(4). doi: 10.4238/gmr15048818.

Park, S. B., Kim, H. Y. and Kim, J. H. (2017) ‘Development of a screening method for the monitoring of 38 genetically modified maize events in food and feed in South Korea’, *Food Control*. Elsevier Ltd, 73, pp. 1459–1465. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.11.009.

Pearsall, D. (2016) ‘GM Crop Coexistence in Practice: Delivering Real Choices for Farmers and Consumers’, *EuroChoices*, 15(1), pp. 12–16. doi: 10.1111/1746-692X.12113.

Piñeyro Nelson, A. *et al.* (2009) ‘Transgenes in Mexican maize: Molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations’, *Molecular Ecology*, 18(4), pp. 750–761. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03993.x.

Pioneer (2017) *Pioneer: Información Técnica*. Available at: https://www.pioneer.com/web/site/bolivia/template.MAXIMIZE/media/release-archives/?javax.portlet.tpst=426d63768b202bc077247724b28e63aa_ws_MX&javax.portlet.prp_426d63768b202bc077247724b28e63aa=viewID%3Dnonassociated_content_display_view&javax.portlet.begCa (Accessed: 11 January 2018).

Plant and Soil Sciences eLibrary (2018) *Plant and Soil Sciences eLibrary*. Available at: <http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1075412493&topic>

order=9&maxto= (Accessed: 13 April 2018).

Poder Legislativo, P. (2000) *Ley N° 2309 Protocolo de Cartagena sobre la seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica*. Paraguay.

Premanandh, J. *et al.* (2012) 'Prevalence of genetically modified foods (GM foods) in the United Arab Emirates', *Food Control*. Elsevier Ltd, 25(1), pp. 10–12. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.10.001.

Quist, D. and Chapela, I. H. (2001) 'Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico', *Nature*, 414(6863), pp. 541–543. doi: 10.1038/35107068.

Rabiei, M. *et al.* (2013) 'Detection of genetically modified maize in processed foods sold commercially in Iran by qualitative PCR', *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), pp. 25–30.

Randhawa, G., Singh, M. and Sood, P. (2016) 'DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain', *Current Science (Bangalore)*, 110(6), pp. 1000–1009. doi: 10.18520/cs/v110/i6/1000-1009.

Red Rural (2016) *Red Rural » Paraguay: Se presentó proyecto de ley para etiquetar alimentos transgénicos*. Available at: <http://redrural.org.py/paraguay-se-presento-proyecto-de-ley-para-etiquetar-alimentos-transgenicos> (Accessed: 11 July 2017).

Ribeiro, I. G. and Marin, V. A. (2012) 'A falta de informação sobre os Organismos Geneticamente Modificados no Brasil', *Ciencias & Saude Coletiva*, 17(2), pp. 359–368.

Rivera Bustamante, R. F., Trejo Saavedra, D. L. and Rodríguez Negrete, E. A. (2015) 'Detection of transgenes in genetically modified organisms and their subproducts', *Acta Universitaria*, 25(NE-3), pp. 24–39. doi: 10.15174/au.2015.906.

Robayo Avendaño, A. and Galindo Mendoza, M. G. (2014) 'Análisis de la probabilidad de dispersión de polen de maíz genéticamente modificado usando el modelo HYSPLIT TT', *Agrociencia*, 48(5), pp. 511–523. Available at: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952014000500005&lang=pt.

Rodríguez Cortesi, J. L. and Rabery Cáceres, S. H. (2003) 'Rendimiento del maíz amiláceo variedad avati moroti sembrado en dos épocas y tres distancias entre hileras', *Investigación Agraria*, 5(2), pp. 30–36.

Rodríguez, L. *et al.* (2016) ‘Crecimiento e índice de cosecha de variedades locales de maíz (*Zea mays* L.) en comunidades de la región frailesca de Chiapas, México’, *Cultivos Tropicales*, 37(3), pp. 137–145. doi: 10.13140/RG.2.1.1404.6967.

San Juan Bobadillo, A. *et al.* (2014) ‘Assessment of Dna Extraction Methods From Various maize (*Zea mays* L.) tissues for environmental gmo monitoring in Mexico. Part I: Detection By end-point PCR’, *Agrociencia*, 48, pp. 17–33.

Santa Maria, M. C., Lajo Morgan, G. and Guardia, L. (2014) ‘Adventitious presence of transgenic events in the maize supply chain in Peru: A case study’, *Food Control*. Elsevier Ltd, 41(1), pp. 96–101. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.01.006.

Schenkelaars, P. and Wesseler, J. (2016) ‘Farm-level GM Coexistence Policies in the EU: Context, Concepts and Developments’, *EuroChoices*, 15(1), pp. 5–11. doi: 10.1111/1746-692X.12112.

Senave (2017) *Listado de eventos de modificación genética liberados comercialmente en el país*. Available at: [http://www.senave.gov.py/docs/servicios/bioseguridad-agricola/2017/Listado de eventos de modificacion genetica liberados comercialmente en el pais.pdf](http://www.senave.gov.py/docs/servicios/bioseguridad-agricola/2017/Listado%20de%20eventos%20de%20modificacion%20genetica%20liberados%20comercialmente%20en%20el%20pais.pdf).

SENAVE (2017) *Organigrama*. Available at: <http://www.senave.gov.py/organigrama.html> (Accessed: 6 July 2017).

Shukla, R. and Cheryan, M. (2001) ‘Zein: The industrial protein from corn’, *Industrial Crops and Products*, 13(3), pp. 171–192. doi: 10.1016/S0926-6690(00)00064-9.

Silva Castro, C. A. (2005) *Maíz genéticamente modificado*, *Agro-Bio*. Available at: www.agrobio.org.

Song, Q., Wei, G. and Zhou, G. (2014) ‘Analysis of genetically modified organisms by pyrosequencing on a portable photodiode-based bioluminescence sequencer’, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 154, pp. 78–83. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.001.

Sun, C. *et al.* (2017) ‘No adverse effects of transgenic maize on population dynamics of endophytic *Bacillus subtilis* strain B916-gfp’, *MicrobiologyOpen*, 6(1), pp. 1–7. doi: 10.1002/mbo3.404.

Turkec, A. *et al.* (2015) ‘DNA extraction techniques compared for accurate detection of genetically modified organisms (GMOs) in maize food and feed products’, *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), pp. 5164–5171. doi: 10.1007/s13197-014-1547-8.

Turkec, A., Lucas, S. J. and Karlik, E. (2016) 'Monitoring the prevalence of genetically modified maize in commercial animal feeds and food products in Turkey', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), pp. 3173–3179. doi: 10.1002/jsfa.7496.

Turrent Fernández, A. *et al.* (2009) 'Liberación comercial de maíz transgénico y acumulación de transgenes en razas de maíz Mexicano', *Revista Fitotec. Me*, 32(4), pp. 257–263.

USDA Foreign Agricultural Service (2016) *Paraguay. Grain and feed annual*.

Valdés, Y. B., Galán, Á. L. and Lizazo, I. C. (2014) 'Determinación del período crítico de competencia de arvenses en el cultivo del maíz (*Zea mays*, L.)', *Cultivos Tropicales*, 35(3), pp. 62–69.

Varela, M. V. (2011) *Estudio de la diversidad genética de colecciones de maíz (zea mays l.) del cono sur de América*. Available at: <http://ambiente.fcien.edu.uy/tesis/Tesis M Vilaro 19-9-11.pdf>.

Vital López, L. *et al.* (2015) 'Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado', *Phyton Revista Internacional de Botánica Experimental*, 84(1), pp. 233–243.

Wohlers, A. E. (2013) 'Labeling of genetically modified food', *Politics & Life Sciences*, 32(1), pp. 58–72. doi: 10.2990/32_1_73.

Wu, F. (2015) 'Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health', *World Mycotoxin Journal*, 8(2), pp. 137–142. doi: 10.3920/WMJ2014.1737.

Wu, Y. *et al.* (2016) 'Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops', *Plant Biotechnology Journal*, 14(3), pp. 1046–1054. doi: 10.1111/pbi.12477.

Zahradnik, C. *et al.* (2014) 'Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: A practical approach', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(27), pp. 6835–6842. doi: 10.1007/s00216-014-7889-2.

ANEXOS

Anexo 1. Muestras de maíces utilizados en el estudio y los lugares de comercialización.

N°	Departamento	Lugar de Comercialización
1	Itapúa 1 (i11, i21)	San Luis del Paraná
2	Itapúa 2 (i21, i22)	Bella Vista
3	Itapúa 3 (i31, i32)	Feria Municipal de Encarnación
4	Itapúa 4 (i41, i42)	María Auxiliadora
5	Itapúa 5 (i51, i52)	Feria de la Avenida Japón de Encarnación
6	Itapúa 6 (i61, i62)	Cooperativa Colonias Unidas
7	Itapúa 7 (i71, i72)	Carmen del Paraná
8	Itapúa 8 (i81, i82)	Natalio (Establecimiento Santa Librada)
9	Canindeyú 1 (c11, c21)	Curuguaty centro
10	Canindeyú 2 (c21, c22)	Colonia Durango 1
11	Canindeyú 3 (c31, c32)	Colonia Durango 2
12	Canindeyú 4 (c41, c42)	Curuguaty Despensa
13	Canindeyú 5 (c51, c52)	Colonia Yvypytá
14	Alto Paraná 1 (a11, a12)	Ciudad del Este (Mercado 1)
15	Alto Paraná 2 (a21, a22)	Ciudad del Este (Mercado 2)
16	Alto Paraná 3 (a31, a32)	Hernandarias
17	Alto Paraná 4 (a41, a42)	Tavapy
18	Alto Paraná 5 (a51, a52)	Santa Rita
19	Canindeyú (P1, P2)	Transgénico Pionner 4285 (Agrotec)
20	Itapúa (SL1, SL2)	San Luis del Paraná
21	Itapúa (VT1, VT2)	VT Triple Pro
22	Itapúa (BT1, BT2)	BT

Anexo 2. Siembra de los granos de maíz. Plántulas de maíz a los 18 días de cultivo.

Se obtuvo una óptima germinación de los granos, la emergencia de los mismos se observó a los 7 días de la siembra. Luego de 18 días de cultivo, las 42 plántulas obtuvieron un buen desarrollo vegetativo, llegando a una altura aproximadamente de 25 cm. Se observó que los cultivares que lograron mayor tamaño fueron los obtenidos como semillas transgénicas.



Fuente: Propia.

Anexo 3. Extracción de ADN. Verificación de la cantidad y calidad de ADN.

En la Tabla 14 se presentan los resultados del protocolo de extracción de ADN basado en CTAB modificado por la Universidad de Córdoba, se obtuvo ADN de buena calidad y cantidad suficiente para el análisis posterior, debido a que todas las muestras se amplificaron correctamente en la PCR. Los valores de concentración de ADN obtenidos en las extracciones, derivados del análisis espectrofotométrico se encuentran entre 1.046,24 ng.µL⁻¹ y 11.243,86 ng.µL⁻¹.

De acuerdo con la relación de absorbancia (Abs) $Abs_{260nm}/280nm$, las muestras presentaron valores de pureza entre 1,89 y 2,29 cercanos al óptimo (entre 1,8 a 2).

Tabla 14. Concentración de ADN (ng ADN/µg de muestra) obtenidas durante la extracción utilizando el método de CTAB modificado.

Muestras	[ADN] ng/µL	Abs _{260/280}
Itapúa 1 (i1)	4.269,72	2,21
Itapúa 2 (i2)	3.370,2	2,28
Itapúa 3 (i3)	8.135,22	2,28
Itapúa 4 (i4)	4.374,85	2,28
Itapúa 5 (i5)	4.248,58	2,29
Itapúa 6 (i6)	4.793,74	2,3
Itapúa 7 (i7)	5.061,86	2,27
Itapúa 8 (i8)	6.170,59	2,3
Canindeyú 1 (c1)	2.106,05	2
Canindeyú 2 (c2)	3.1571, 94	2,81
Canindeyú 3 (c3)	1.775,26	1,94
Canindeyú 4 (c4)	1.806,9	1,89
Canindeyú 5 (c5)	10.189,56	2,29
Alto Paraná 1 (a1)	2.641,07	2,1
Alto Paraná 2 (a2)	1.046,24	2,22
Alto Paraná 3 (a3)	10.669,13	2,1
Alto Paraná 4 (a4)	11.243,86	2,15
Alto Paraná 5 (a5)	9.662,33	2,28
San Luis (SL)	10.266	2,2
Bt (Bt)	6.935,77	2,27
Pioneer (Pi)	9.135, 54	2,38

Fuente: Propia

Anexo 4: Construcciones de todos los eventos aprobados en Paraguay hasta la fecha.

