

Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos

Detection of transgenes in genetically modified organisms and their subproducts

Diana Lilia Trejo-Saavedra*, Edgar Antonio Rodríguez-Negrete*, Rafael F. Rivera-Bustamante*

RESUMEN

La ingeniería genética de plantas permite la manipulación directa del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés), posibilitando la creación de nuevos genes (transgenes), usando elementos provenientes de varios organismos y la introducción de éstos en plantas (plantas u Organismos Genéticamente Modificados [OGM]) para conferirles nuevas características. Los principales cultivos OGM son la soya, el maíz y el algodón. México está expuesto a liberaciones no controladas de OGM. La relevancia de esta liberación aumentará cuando se trate de especies cuyo centro de origen o diversidad se encuentre en nuestro país. Por lo tanto, es necesario diseñar estrategias que permitan detectar la presencia de OGM. Este trabajo tiene como objeto desarrollar y validar metodologías para la detección de OGM y sus subproductos, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La estandarización incluye procesos que incrementen la reproducibilidad y el uso de reactivos fácilmente accesibles para permitir su implementación en diferentes laboratorios.

ABSTRACT

Recombinant DNA technologies allow the assembly of new genes (*transgenes*) that can be introduced into plants to confer them new characteristics. The new varieties are known as *transgenic crops* and are included in the widely used generic term *Genetically Modified Organism* (GMO). Corn, soybean and cotton are the most important transgenic crops whereas the most common traits are herbicide and insect tolerance. Mexico is exposed to unintentional releases of GMO into the environment. It will cause a problem when diversity is affected. Therefore, there is a need to develop procedures that will allow the detection or identification of transgenes in GMO as well as in GMO-related products. The objective of this study is to develop and validate some procedures to detect transgenes in GMO and GMO-derived products using PCR-based assays. Increase reproducibility and the use of accessible reagents are important part of the strategy in order to standardize and facilitate its implementation through different laboratories.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología moderna, y en particular la ingeniería genética, permite la manipulación y el acceso directo a la información contenida en el ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés), incluso posibilita la creación de nuevas combinaciones de genes. Por ello, las técnicas empleadas en ingeniería genética rompen las barreras impuestas por la incompatibilidad sexual y permiten introducir en plantas genes de nuestro interés junto con los elementos genéticos importantes para que su expresión sea adecuada. Ambos componentes (genes y elementos reguladores) pueden provenir de cualquier tipo de organismos. Por ejemplo, pueden venir de otra planta, pero también de organismos más distantes como hongos, virus, bacterias y animales. A estos “nuevos genes” se les llama diferencialmente *transgenes*. Los transgenes confieren nuevas características a los organismos receptores a los que se les denomina *organismos transgénicos*, y de manera genérica Organismos Genéticamente Modificados (OGM o GMO, en inglés). Entre las características

Recibido: 25 de agosto de 2014
Aceptado: 23 de marzo de 2015

Palabras clave:
OGM; plantas transgénicas; PCR.

Keywords:
GMO; transgenic plants; PCR.

Cómo citar:
Trejo-Saavedra, D. L., Rodríguez-Negrete, E. A., & Rivera-Bustamante, R. F. (2015). Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria*, 25(NE-3), 24-39. doi: 10.15174/au.2015.906

* Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Unidad Irapuato km. 9.6, Libramiento Norte, Apdo. Postal 629, Irapuato, Guanajuato, México, C.P. 36500, Tel.: (462) 623 9655. Correo electrónico: rrivera@ira.cinvestav.mx

más buscadas se encuentran la resistencia a plagas, a patógenos y a factores abióticos. Igualmente, es de gran interés la introducción de proteínas que mejoren la calidad nutricional de las plantas o de sus productos, así como plantas que produzcan metabolitos de alto valor agregado, etcétera. Por lo anterior, la ingeniería genética representa una herramienta muy versátil y precisa para producir variedades vegetales mejoradas de muchos tipos de cultivos (Ahmad *et al.*, 2012; Cabello, Lodeyro & Zurbriggen, 2014; Trejo-Saavedra, 2000; Varshney, Bansal, Aggarwal, Datta & Craufurd, 2011).

A la fecha, la mayoría de los cultivos transgénicos han sido desarrollados por el sector privado generando en algunos sectores una impresión negativa debido a una percepción de actitud monopólica. El Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (SIAAA) estima que en 2015 más de 20 millones de agricultores estarán sembrando alrededor de 200 millones de hectáreas de cultivos transgénicos en al menos cuarenta países. Actualmente, los países en vías de desarrollo representan más del 50% del área global de cultivos transgénicos. En el continente americano, además de los Estados Unidos de América y Canadá, destacan Brasil y Argentina como grandes productores a nivel mundial (figura 1a). Más recientemente, Paraguay, Bolivia y México se han incorporado al grupo de países productores de OGM (James, 2013).

A pesar del incremento en la producción de OGM, la ingeniería genética de plantas y la comercialización de semillas transgénicas y sus subproductos siguen generando controversia en aspectos socioeconómicos, de salud y de impacto ecológico, principalmente. Para los defensores de la tecnología, los transgénicos representan una alternativa importante para los agricultores, ya que ofrecen soluciones importantes en algunos problemas de plagas y malezas (Cruz, 2002; Wolfenbarger & Phifer, 2000), así como la posibilidad de mejorar la calidad nutricional de alimentos de importancia mundial. Los detractores de la biotecnología agrícola, por otro lado, arguyen riesgos potenciales a la salud humana y al medio ambiente, incluyendo a la biodiversidad, así como el potencial control monopólico de la tecnología por parte de empresas transnacionales (Ahmed, 2002; Wintermantel & Schoeetz, 1996).

El área estimada para cultivos transgénicos en el 2013 fue de 175.2 millones de hectáreas, mostrando un incremento del 3% sobre el área sembrada en el 2012 (James, 2013). Las cuatro especies que han sido más ampliamente cultivadas son la soya, que ocupó el 37.8% del área global de transgénicos, el maíz con el 56%, el algodón con un 10.6% y la canola con un 5% (figura 1b, 1c). La tolerancia a herbicidas ha sido de manera consistente la característica dominante en los cultivos modificados liberados comercialmente. La segunda característica en importancia es la resistencia a insectos a través de las proteínas Bt (provenientes de *Bacillus thuringiensis*) (Brookes & Barfoot, 2014; James, 2013).

México es centro de origen y diversidad de un gran número de especies vegetales, por lo que se ha trabajado arduamente en actualizar las leyes de bioseguridad agrícola para estar en condiciones de responder a esta nueva tecnología. Paralelamente, México es uno de los principales socios comerciales de Estados Unidos de América y Canadá, países en primer y quinto lugar, respectivamente, de la lista de productores de OGM a nivel mundial (GMO Compass, 2010; United States Department of Agriculture [USDA], 2012). En ambos países, los productos OGM no requieren ningún tratamiento especial, por ejemplo, la separación de sus contrapartes no transgénicas. Esto implica que al exportar sus productos vegetales, éstos pueden tener un porcentaje variable de la versión transgénica del cultivo. Esto ha hecho que varios grupos o instituciones mexicanas e internacionales soliciten más investigaciones para asegurarse de que nuestra biodiversidad no corre ningún riesgo, ya que algunos de los productos frecuentemente importados tienen en nuestro país su centro de origen o diversidad (R. A. Álvarez-Morales, comunicación personal, 16 de agosto de 2013).

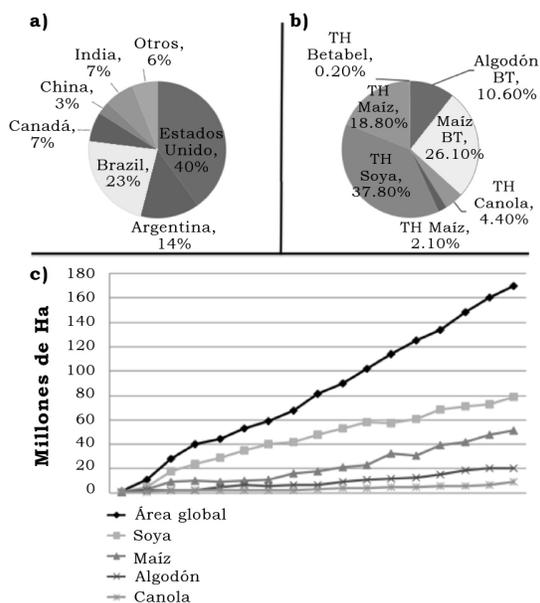


Figura 1. a) Esquema de los mayores productores de cultivos transgénicos en el año 2012. b) Esquema de las principales características de los cultivos transgénicos en el año 2012. c) Área global (millones de Ha) de cultivos transgénicos en el periodo 1996-2012.

Fuente: James (2013).

Como parte de esta preocupación, en 1989 la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) conformó el Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA). Este organismo estuvo supervisando y analizando las solicitudes para la liberación al ambiente de OGM en México. Posteriormente, por un acuerdo emitido en 1999 se crea la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados (Cibiogem), cuyo objetivo es coordinar las políticas de la administración pública federal relativas a la bioseguridad y a la producción, importación, exportación, movilización, propagación, liberación, consumo y, en general, uso y aprovechamiento de OGM, sus productos y subproductos (Ley Mexicana de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados [LBOGM], 2005; Reglamento de la LBOGM, 2009; Cibiogem, 2012). Desde el punto de vista internacional, en mayo del 2000 fue firmado y aprobado por varios países, incluyendo México, el protocolo de Bioseguridad de Cartagena (Hassler, 1999; R. A. Álvarez-Morales, comunicación personal, 16 de agosto de 2013), el cual pone en efecto reglas que gobiernan el comercio y transferencia de OGM en fronteras internacionales, y permite a los gobernantes prohibir la importación de OGM cuando haya preocupación sobre su seguridad (Gupta, 2000). Siguiendo el principio precautorio emanado del Protocolo de Cartagena, México emite en 2005 la LBOGM para regular todas las actividades relacionadas con OGM.

A pesar de los avances a nivel regulatorio, México sigue estando expuesto a liberaciones no controladas de OGM. Por ejemplo, con la importación de granos desde países productores de OGM se introducirá una mezcla de granos genéticamente modificados (GM) y no modificados. En algunas condiciones, estos granos intencionados para fines industriales podrían usarse como semilla, generando así una liberación al ambiente de manera no intencional. La relevancia de una libera-

ción no controlada de este tipo aumenta cuando se trate de especies cuyo centro de origen o diversidad se encuentre en nuestro país.

Situaciones como las antes mencionada han requerido que gobiernos, industria alimentaria, laboratorios de análisis y productores de cultivos desarrollen sistemas que sean confiables para la detección y cuantificación de OGM en cultivos, alimentos e ingredientes alimenticios.

Existen varios métodos para la detección de OGM. Algunos están basados en la detección de la secuencia nucleotídica (DNA) del transgén. Otros en la detección de su principal producto, la proteína codificada por el transgén (Schreiber, 1999). Una tercera alternativa es la evaluación de la característica adquirida a través de la inserción del transgén, por ejemplo, la resistencia a un herbicida. La selección de método a utilizarse dependerá de varios factores: el tipo de material biológico (muestra al natural o procesada), el número y tamaño de muestra a analizar, la urgencia de los resultados, la certeza requerida (identificación general de OGM o del evento específico por analizar), etcétera.

La identificación precisa de los genes utilizados para conferir las características deseadas es un prerrequisito esencial de la regulación en biotecnología. La secuencia de los genes y los elementos regulatorios usados se conocen perfectamente, y en muchos casos se ha determinado inclusive en qué sitio del genoma de la planta se ha insertado el transgén (Álvarez-Morales *et al.*, 1999). Esta información es de singular relevancia para el diseño de metodologías de detección de eventos de transformación específicos. En la figura 2 se esquematizan algunos ejemplos de las regiones detectadas en las primeras generaciones de transgénicos, específicamente el promotor 35S (p335) y el terminador del gen de la nopalina sintetasa (tNOS).

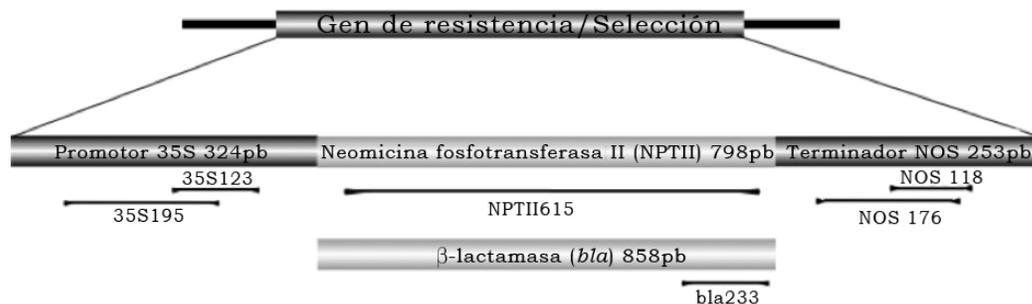


Figura 2. Ejemplos de genes quiméricos utilizados en la transformación de plantas. Un gen quimérico consiste de una región promotora, un marco de lectura abierta (región codificante) y una señal de terminación de la transcripción. En este ejemplo se muestra el gen de la neomicina transferasa NPTII (y de la β -lactamasa, *bla*), cuya expresión está regulada por el promotor 35S del CaMV y la señal de terminación de la transcripción tNOS. Se incluyen las estrategias diseñadas para la detección por medio de la amplificación por PCR. Se ilustra su localización en el transgén y el tamaño del producto esperado en pares de bases (pb).

Fuente: Elaboración propia.

Dos técnicas son comúnmente utilizadas para la detección de fragmentos específicos de DNA: hibridación molecular a través de un análisis tipo *Southern blot* y detección por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

El análisis tipo *Southern blot* generalmente involucra la detección de DNA genómico cortado con una enzima de restricción y separado a través de electroforesis en geles de agarosa. El DNA contenido en el gel es transferido y fijado en membranas de nylon. Esta membrana es hibridada con sondas específicas que identifican el gen de interés y que van marcadas con ^{32}P o fluorescencia. La señal de la sonda es detectada únicamente si ésta fue capaz de hibridar (aparear) con un fragmento de DNA con una secuencia complementaria a ella en un alto porcentaje. Este método de detección es considerado menos sensible que el PCR (explicado abajo), pues se requieren más de 20 copias del gen que se quiere detectar. Por otro lado, en el caso de la técnica basada en PCR las moléculas detectadas pueden provenir de la amplificación de hasta una sola copia o molécula de DNA molde (Sambrook & Russel, 2000).

La PCR permite la amplificación específica de segmentos de DNA que se encuentran en una baja frecuencia en una mezcla compleja de otras secuencias de DNA (Álvarez-Morales, Jofre & Trejo-Saavedra, 2008; Dieffenbach & Dveksler, 1995). El segmento amplificado puede ser visualizado después de haberlo separado a través de electroforesis en geles de agarosa y comparado con fragmentos de tamaños ya conocidos (marcadores de peso molecular) (Ahmed, 1995). Un paso crucial y limitante para la detección por PCR es la extracción y purificación del DNA. Los límites de detección están en un rango de 20 pg a 10 ng de DNA blanco y 0.0001%-1% de la fracción en masa de OGM (Yates, 1999). En la actualidad existen variantes de la técnica de PCR que tienen mayor sensibilidad: el PCR semicuantitativo y el PCR en tiempo real. Estas técnicas son utilizadas para identificar cualitativa y cuantitativamente el transgén (Acatzi, Gálvez, Plasencia & Quirasco, 2014; Ahmed, 2002; SanJuan-Badillo, Gálvez, Plasencia & Quirasco, 2014). En el PCR en tiempo real no es necesario observar el producto amplificado a través de tinción en geles de agarosa, pues la detección se realiza con sondas marcadas con un fluoróforo que es detectado por el sistema óptico de detección de fluorescencia en el momento en que la sonda se hibrida al gen. La detección es directamente transferida a un *software* diseñado para graficar la amplificación cada cierto tiempo (2 seg a 3 seg) y en cada ciclo, pudiendo también hacer el cálculo del número de copias presentes en la muestra de DNA (Huang, Cheng, Wang, Zhang & Yang, 2013).

Algunos grupos en diferentes países (de la Unión Europea, Suiza y Japón) comenzaron a diseñar estrategias de detección de OGM. Algunos diseñaron PCR múltiples para distinguir cinco líneas de maíz (Matsuoka *et al.*, 2000), algunos otros han utilizado PCR en tiempo real logrando detectar hasta 0.68% de OGM en maíz (Vaïtilongom, Pijnenburg, Gendre & Brignon, 1999). Otros grupos estandarizaron PCR en tiempo real para detectar OGM en eventos específicos de maíz y soya (Lipp, Brodman, Pietsch, Pauwels & Anklam, 1999; Vollenhofer, Burg, Schmidt & Kroath, 1999; Zimmermann, Luthy & Pauli, 2000).

Con base en las necesidades ya señaladas, este trabajo tiene como objetivo desarrollar, adaptar y/o validar metodologías para la detección de OGM, así como de sus subproductos, utilizando una metodología basada en PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron diferentes tipos de productos vegetales crudos, dentro de los cuales se encuentran frutos como jitomate, tubérculos de papa, semillas de maíz y soya, así como alimentos procesados, verduras y granos enlatados, jugo de frutas, purés, harinas y frituras de diversas marcas comerciales, además de tejido vegetal fresco (tallos, hojas) de plantas de algodón, soya, tabaco, maíz, jitomate y chile.

Extracción de DNA

Los métodos de extracción de DNA fueron seleccionados de acuerdo con la facilidad de uso y costo, y se utilizaron soluciones comerciales para homogenizar resultados y evitar problemas por la elaboración de soluciones.

Se evaluaron tres métodos principalmente: *Plant DNAzol® Reagent* de Gibco (ahora *Invitrogen Life Technologies*), solución con base de urea reportado por Shure, Wessler & Fedoroff (1983) y *Phytopure® Kit* de *Amersham Pharmacia Biotech®*.

Estos tres métodos de extracción fueron probados con todo el material biológico mencionado (semillas, tejido vegetal, harinas, enlatados, congelados, jugos, alimento de infantes, etc.).

Protocolo modificado (DNazol) para extracción de DNA genómico de plantas, frutos, semillas y productos procesados

- Pesar la cantidad de muestra necesaria de acuerdo con la tabla 1.

Nota: antes de tomar la muestra de jugos, néctares y alimento líquido, agitar vigorosamente. Las harinas se hidratan hasta formar una mezcla espesa y fluida (consistencia de atole) antes de pesar la muestra.

- Colocar la muestra en tubos de micro centrífuga de 1.5 ml o 2 ml.
- Congelar las muestras sólidas en nitrógeno líquido para facilitar la molienda. Las muestras líquidas dejarlas a temperatura ambiente (25 °C).

Punto importante:

Si no se tiene nitrógeno líquido disponible, entonces colocar los tubos en hielo y agua (4 °C).

- Moler las muestras congeladas en homogenizador con punta de metal o desechable, no dejar descongelar la muestra colocando el tubo en un recipiente pequeño con un poco de nitrógeno o enfriando con agua-hielo.

Nota: después de moler cada muestra, lavar la punta de metal con agua destilada, flamear con etanol y volver a enfriar, o eliminar la desechable.

- Adicionar 300 µl de la solución de extracción a 0.2 g de muestra sólida molida, para mayor cantidad de muestra entonces aumentar proporcionalmente. En muestras líquidas adicionar 500 µl de la solución de extracción.
- Incubar de 5 min a 10 min a temperatura ambiente mientras se procesan las muestras restantes.
- Adicionar la misma cantidad de fenol: cloroformo (1:1 v/v) a 4 °C y agitar vigorosamente hasta mezclar por 5 seg, de preferencia en un agitador tipo Vortex.
- Incubar por 5 min a temperatura ambiente y agitar cada minuto.
- Centrifugar 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg. Se formarán dos fases, quedando entre ellas las proteínas precipitadas.
- Pasar el sobrenadante (fase superior) a un nuevo tubo, evitando llevarse con la muestra parte de las proteínas.
- Adicionar 300 µl de fenol: cloroformo (1:1 v/v) a 4 °C y agitar vigorosamente hasta mezclar por 5 seg.
- Centrifugar nuevamente por 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg. Se formarán dos fases, quedando entre ellas las proteínas precipitadas.
- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.

- Adicionar 300 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) a -20 °C y mezclar vigorosamente.
- Centrifugar por 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg, se formarán dos fases, pueden quedar o no entre ellas las proteínas precipitadas.
- Pasar el sobrenadante a tubos nuevos.
- Adicionar 300 µl de cloroformo: isoamílico (24:1 v/v) -20 °C y mezclar vigorosamente.
- Centrifugar por 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg, Se formarán dos fases.
- Pasar sobrenadante a tubos nuevos.
- Adicionar un volumen de isopropanol 100% a -20 °C, invertir de 5 a 8 veces para mezclar.
- Centrifugar por 5 min a 7800 xg.
- Obtenida la pastilla, tirar sobrenadante.

Nota: algunas veces la pastilla se precipita hidratada (en forma de una gota densa), en este caso el sobrenadante se tiene que retirar con pipeta para evitar perder la gota precipitada.

- Adicionar 300 µl de etanol al 70%, e invertir vigorosamente de 5 a 8 veces.
- Centrifugar a 12 000 xg por 5 min.
- Eliminar el etanol.
- Dejar evaporar el exceso de etanol.
- Resuspender la pastilla en 100 µl de agua desionizada estéril.

Puntos importantes:

- En la extracción de tejido vegetal, el DNA se lavará dos veces con fenol: cloroformo y una con cloroformo: alcohol isoamílico.
- Para el DNA de harinas se adicionará un lavado más de cloroformo: isoamílico.
- Para jugos y néctares se llevará a cabo la técnica como es indicado.

Protocolo modificado (Phytopure) para la extracción de DNA de harinas y frituras

- Moler en homogenizador las muestras sólidas e hidratar hasta formar una mezcla espesa y fluida.

- Pesar 0.4 g de muestra hidratada.
- Colocar la muestra en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml o 2 ml.
- Adicionar 800 µl de la solución 1 (Kit comercial Plant DNAzol) y mezclar en agitador o Vortex.
- Agregar 250 µl de la solución 2 (Kit comercial Plant DNAzol) y mezclar nuevamente.
- Incubar por 10 min a 65 °C, agitando continuamente.
- Incubar en hielo-agua (4 °C) 20 min agitando continuamente.
- Terminada la incubación, agregar 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) a -20 °C, y agitar hasta mezclar por 5 seg.
- Agregar 120 µl de la resina y agitar hasta mezclar por 10 min.
- Centrifugar a 2000 xg por un tiempo de 10 min. Se formarán dos fases, quedando entre ellas las proteínas precipitadas al igual que la resina.
- Pasar el sobrenadante (fase superior) a un tubo nuevo y agregar 700 µl de fenol: cloroformo (1:1 v/v) a 4 °C.
- Agitar hasta formar una suspensión lechosa.
- Centrifugar a 15 000 xg por 5 min - 8 min a 12 000 xg.
- Pasar sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 700 µl de fenol: cloroformo (1:1 v/v) a 4 °C y agitar hasta mezclar.
- Centrifugar a 15 000 xg por 5 min u 8 min a 12 000 xg.
- Pasar sobrenadante a otro tubo nuevo y lavar la muestra con 500 µl de cloroformo: isoamílico (24:1 v/v) -20 °C.
- Centrifugar a 15 000 xg por 5 min u 8 min a 12 000 xg.
- Lavar nuevamente con cloroformo.
- Pasar sobrenadante a un tubo nuevo, y precipitar con un volumen de isopropanol a -20°C.
- Centrifugar a 7800 xg por 5 min.
- Obtenida la pastilla, tirar sobrenadante y lavar con 200 µl etanol al 70% dos veces.
- Eliminar el etanol 70%.
- Dejar evaporar el exceso de etanol.
- Resuspender la pastilla en 100 µl de agua desionizada estéril.

Protocolo modificado (urea) para extracción de DNA genómico de plantas, frutos, semillas y productos procesados (Shure, Wessier & Fedoroff, 1983)

- Pesar la cantidad de muestra necesaria de acuerdo con la tabla 1.

Nota: antes de tomar la muestra de jugos, néctares y alimento líquido, agitar vigorosamente. Las harinas se hidratan hasta formar una mezcla espesa y fluida antes de pesar la muestra.

- Colocar la muestra en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml o 2 ml.
- Congelar las muestras sólidas en nitrógeno líquido para facilitar la molienda.
- Las muestras líquidas dejarlas a temperatura ambiente (25 °C).

Punto importante:

Si no se tiene nitrógeno líquido disponible, entonces colocar los tubos en hielo y agua (4 °C).

- Moler las muestras congeladas en homogenizador con punta de metal, no dejar descongelar la muestra, colocando el tubo en un recipiente pequeño con un poco de nitrógeno.

Nota: después de moler cada muestra, lavar la punta con agua destilada y flamear con etanol.

- Adicionar 300 µl de la solución de extracción a 0.2 g de muestra sólida molida, para mayor cantidad de muestra entonces aumentar proporcionalmente. En muestras líquidas adicionar 500 µl de la solución.
- Incubar de 5 min a 10 min a temperatura ambiente.
- Adicionar la misma cantidad de fenol: cloroformo (1:1 v/v) a 4 °C y agitar vigorosamente hasta mezclar por 5 seg de preferencia en un agitador tipo Vortex.
- Incubar por 5 min a temperatura ambiente, y agitar cada minuto.
- Centrifugar 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg. Se formarán dos fases, quedando entre ellas las proteínas precipitadas.
- Pasar el sobrenadante (fase superior) a un nuevo tubo, evitando llevarse con la muestra parte de las proteínas.
- Adicionar 300 µl de fenol: cloroformo (1:1 v/v) a 4 °C y agitar vigorosamente por 5 seg.

- Centrifugar nuevamente por 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg. Se formarán dos fases, quedando entre ellas las proteínas precipitadas.
- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar 300 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) a -20 °C y mezclar vigorosamente.
- Centrifugar por 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg. Se formarán dos fases, pueden quedar o no entre ellas las proteínas precipitadas.
- Pasar el sobrenadante a tubos nuevos.
- Adicionar 300 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) -20 °C y mezclar vigorosamente.
- Centrifugar por 5 min a 15 000 xg u 8 min a 12 000 xg. se formarán dos fases.
- Pasar sobrenadante a tubos nuevos.
- Adicionar 1 volumen de isopropanol 100% a -20 °C, invertir de 5 a 8 veces para mezclar.
- Centrifugar por 5 min a 7800 xg.
- Obtenida la pastilla, tirar sobrenadante.
- Adicionar 300 µl de etanol al 70% e invertir vigorosamente de 5 a 8 veces.
- Centrifugar a 12 000 xg por 5 min.
- Eliminar el etanol 70%.
- Dejar evaporar el exceso de etanol.
- Resuspender la pastilla en 100 µl de agua desionizada estéril

Puntos importantes:

- En la extracción de tejido vegetal, el DNA se lavará dos veces con fenol: cloroformo y una con cloroformo: alcohol isoamílico.
- Para el DNA de harinas se adicionará dos lavados más de cloroformo: alcohol isoamílico.
- Para jugos y néctares se llevará a cabo la técnica como es indicado.

Solución de urea:

0.35M de NaCl
0.05M Tris-HCl pH 8
0.02M EDTA
1% SDS
7M urea

Tabla 1.
Ejemplos de tipos de muestras para extracción de DNA.

Tipo de muestra	Peso (g)
Tejido vegetal	0.2
Frutos jugosos	0.4
Jugos	0.5
Néctares	0.3
Embriones de semillas	0.2
Alimento líquido	0.5
Harinas	0.3

Tejido vegetal: discos de hoja, muestras de tallo, raíces, flores.
Frutos jugosos: jitomate o frutos parecidos.
Embriones de semillas: puede ser semillas crudas (maíz), enlatadas. Remojar las semillas crudas en agua a 40 °C por 2 h para extraer el embrión.
Alimento líquido: purés de tomate, alimento de soya.
Fuente: Elaboración propia.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la estandarización del análisis de PCR se diseñó un par de iniciadores para amplificar el gen de ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés) ribosomal 16S de cloroplasto. Este gen es altamente conservado en plantas, y la reacción indicará si la concentración y la condición del DNA son las adecuadas, antes de proceder a la detección (figura 2, tabla 2).

Para la detección del promotor 35S (p35) y terminator NOS (tNOS) se llevó a cabo el análisis con base en lo reportado por Lipp *et al.* (1999). En este trabajo, las condiciones de amplificación fueron modificadas tratando de mantener las temperaturas de alineamiento similares para cada uno de los iniciadores utilizados y así poder facilitar la detección de diferentes transgenes en la misma corrida.

Para llevar a cabo la técnica de PCR se utilizaron reactivos de dos casas comerciales: Taq DNA polimerasa Roche® y Gibco®, únicamente para comparar la eficiencia de amplificación entre marcas.

Se utilizaron diferentes termocicladores *Perkin Elmer, Mini cycler MJ Research, Robo cycler 40 Strata-gene, iCycler Bio-Rad*, para comparar resultados de amplificación entre cada uno de los termocicladores, ya que hay gran diferencia en el tiempo del cambio de temperatura de los modelos más recientes y los anteriores, así como entre las diferentes marcas.

Las secuencias de los iniciadores utilizados para la detección del gen 16S ribosomal, del gen β-lactamasa (*bla*) y neomicina fosfotransferasa II (NPTII) fueron analizadas con cada uno de los programas, *Oligo 4.0, Geneworks, LaserGene* y *MacVector* para corroborar

que las temperaturas de alineamiento fueran similares. En la tabla 2 se describe cada uno de los iniciadores sintetizados, así como el tamaño del producto esperado.

Inicialmente se validaron los iniciadores que amplifican secuencias del p35S y el tNOS, al igual que los genes de selección gen de *bla* (resistencia a ampicilina), NPT II (resistencia a kanamicina), con DNA plasmídico y posteriormente con DNA de plantas positivas para estos genes.

Tabla 2.
Lista de iniciadores diseñados para la amplificación del p35S, tNOS, *bla*, NPT II y 16S ribosomal.

Nombre del gen	Tamaño esperado (pb)	Orientación	Secuencia
tNOS *	118	(sentido)	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG
tNOS	118	(antisentido)	GACACCGCGCGGATAATTTATCC
p35S *	123	(sentido)	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
p35S	123	(antisentido)	TCCTCTCAAATGAAATGAACTTCC
tNOS*	176	(sentido)	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG
tNOS	176	(antisentido)	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA
p35S *	195	(sentido)	GCTCCTACAAATGCCATCA
p35S	195	(antisentido)	GATAGTGGGATTGTGCGTCA
16S **	315	(sentido)	TGAGAATGGATAAGAGGCTC
16S	315	(antisentido)	TGTTGTCCCTCCCAAGGG
<i>bla</i> **	233	(sentido)	AATAGACTGGATGGAGGCGG
<i>bla</i>	233	(antisentido)	TCAGTGAGGCACCTATCTCAGC
NPTII**	615	(sentido)	TATTCGGCTATGACTGGGCA
NPTII	615	(antisentido)	GCCAACGCTATGTCCTGATA

* Lipp *et al.* (1999).

** Diseñados para este trabajo.

Fuente: Elaboración propia.

Detección del p35S, del tNOS, del gen 16s ribosomal y de los genes NPT II y *bla*, por el método de PCR

Preparación de alicuotas para PCR (Roche)

Cada alicuota deberá tener las siguientes concentraciones para un volumen final de reacción de 25 µl:

<i>Polimerasa Taq</i>	0.5 U
Solución para PCR+ MgCl ₂ 10X (incluido en el Kit)	2.5 µl (0.25 X)
dNTPs	0.5 µl de la mezcla de dNTP 10 mM c/u
Agua desionizada estéril	c.b.p. 5 µl

Preparación para alicuotas (Gibco)

Solución para PCR 10X (incluido en el Kit)	1.75 µl (3.5 X)
MgCl ₂ 50 mM	0.75 µl (1.5 mM)
dNTPs	0.5 µl de la mezcla de dNTP 10 mM c/u
<i>Polimerasa Taq</i>	0.5 U
Agua desionizada estéril	c.b.p. 5 µl

Preparación de las mezclas para análisis

- A las alicuotas (5 µl) adicionar los iniciadores específicos (sentido y antisentido) con una concentración de 100 ng cada uno.
- Adicionar la cantidad de DNA dependiendo de la concentración que tenga el mismo, el rango manejado es de 5 ng/µl a 10 ng/µl.
- Añadir agua desionizada estéril c.b.p. 25 µl.

Nota: puede manejarse diferente el orden de los reactivos.

- Mezclar perfectamente y centrifugar por 3 seg - 5 seg para bajar lo que se haya quedado en las paredes del tubo.

Las condiciones para la corrida de PCR son:

Desnaturalización	94 °C	1.30 min	} 35 Ciclos
Inicial	94 °C	30 seg	
Desnaturalización	55 °C	40 seg	
Alineamiento	72 °C	1 min	
Síntesis	72 °C	3 min	

Nota importante: al utilizar los termocicladores marca *Perkin Elmer, Mini cycler MJ Research*, el tiempo de alineamiento se aumenta a un minuto. Si se utilizan los termocicladores *Robo cycler 40 Stratagene, iCycler Bio-Rad* el tiempo puede bajar hasta 20 seg.

Análisis tipo *Southern* no radiactivo

La hibridación no radiactiva se realizó para corroborar la identidad de los productos de la amplificación de las reacciones de PCR, usando el Kit de marcaje de sondas *Gene Images™ (Random prime labelling module) de Amersham Pharmacia Biotech®*, utilizando nucleótidos marcados con fluoresceína y un anticuerpo antifluoresceína ligado a fosfatasa alcalina para la detección.

El marcaje de la sonda se hizo conforme al protocolo sugerido por el *Kit*.

Para la preparación de la sonda del p35S se utilizó el plásmido pCambia 2300. Se hizo una restricción con las enzimas *Hind* III y *Bgl* II para obtener el fragmento del p35S.

RESULTADOS

Establecimiento de técnicas eficientes y reproducibles para la extracción de DNA de diferentes muestras crudas (tejido fresco) o procesadas (jugos, purés, enlatados, congelados, horneados y harinas)

En un inicio se llevaron a cabo los métodos conforme al protocolo sugerido por cada fabricante. Posteriormente se hicieron algunas modificaciones para obtener algunos DNA de buena calidad, ya que el conseguido inicialmente estaba degradado y con impurezas que provocaron la inhibición de la reacción de PCR.

Después de hacer las modificaciones se llegó a la conclusión de que el método por el cual se obtiene ma-

yor cantidad de DNA (7 μ g - 11 μ g por cada 100 mg de tejido), con menor cantidad de proteínas y menor degradación, era una modificación del método basado en el kit DNazol (figura 3a). Sin embargo, los métodos de urea modificado y Phytopure modificado también generaron resultados aceptables en el caso de muestras directas de tejido vegetal y de algunos productos procesados. En ambos casos, aunque el DNA se obtuvo con un nivel de degradación mayor y en una menor concentración final (3 μ g - 5 μ g y 5 μ g - 10 μ g por cada 100 mg de tejido, respectivamente), la calidad del DNA fue suficiente para ser analizado por medio de PCR.

Con estos resultados se decidió adoptar el método DNazol modificado para las subsiguientes extracciones de DNA de productos procesados. Los alimentos procesados analizados incluyeron maíz enlatado, jugo de frutas, alimento de soya, queso de soya, productos de papa y harinas, entre otros (figura 3b). Cabe mencionar que no es posible obtener una cantidad homogénea de DNA entre diferentes productos procesados, ya que el proceso para su elaboración difiere tanto entre un producto y otro como entre lotes del mismo producto. Sin embargo, la calidad del DNA producido por DNazol en todos los casos fue suficiente para ser amplificado por PCR.

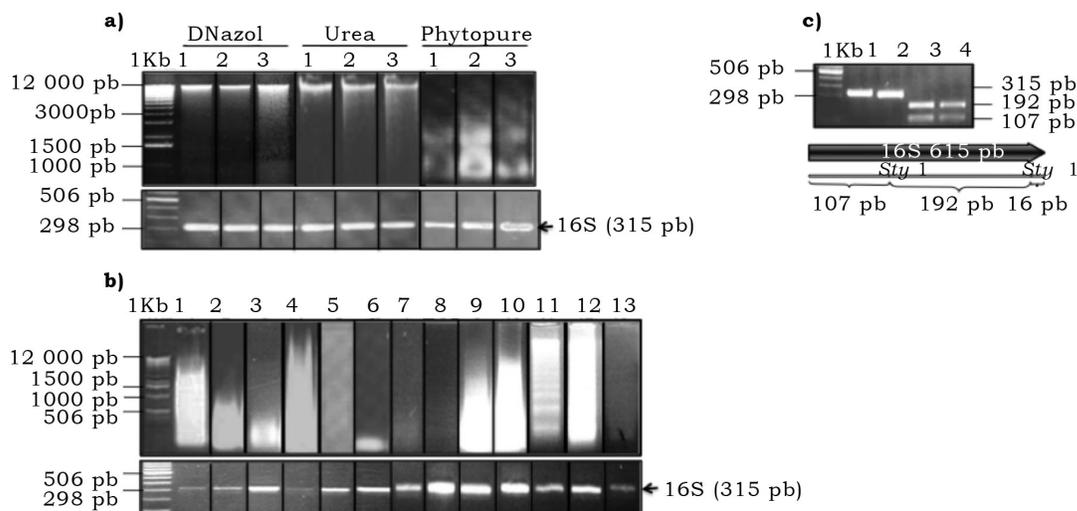


Figura 3. Extracción de DNA utilizando diferentes métodos. a) Tejido vegetal de 1, jitomate; 2, papa; 3, tabaco. En cada uno de los geles se cargaron 5 μ l del DNA extraído de 200 mg de tejido. b) Extracciones de DNA con el método DNazol modificado, de diferentes productos procesados. 1, DNA de maíz enlatado; 2, DNA de jugo de frutas; 3, DNA de queso de soya; 4, DNA de puré de jitomate; 5, DNA de alimento de soya (AdeS); 6, DNA de papas fritas (Sabritas); 7, DNA extruido de papa para fritura (sin marca); 8, tortilla comercial; 9, harina de maíz (Maseca); 10, DNA de cereal de maíz (Maizoro, CornPos, Zucaritas); 11, DNA de papas fritas (Pringles); 12, harina de semillas de soya; 13, Gerber de pollo con vegetales y/o pera. Se muestra el control 16S para todas las extracciones de DNA. c) Identificación del producto de PCR del gen de RNA ribosomal 16S. Corte de la amplificación 16S con la enzima de restricción *Sty* I. 1 y 2, amplificación del 16S ribosomal; 3 y 4, corte de la amplificación del 16S ribosomal con la enzima *Sty* I. Se muestra un esquema de los sitios de restricción *Sty* I. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de Invitrogen.

Fuente: Elaboración propia.

Estandarización de la técnica de PCR para la detección del promotor 35S y el terminador NOS

Una vez que se tiene estandarizado el método de extracción de DNA, se debe asegurar que el DNA tiene las condiciones adecuadas para ser amplificado. Para comprobar esto, se amplifica un gen endógeno o de referencia, es decir, un gen que se encuentre en todos los tipos de células de la muestra y que su expresión se mantenga constante durante el ensayo. En nuestro caso, decidimos utilizar el gen ribosomal 16S como indicador. Primero, se hizo una búsqueda de la secuencia del 16S de cloroplasto en el banco de genes, de la cual resultaron tres genes (tabaco, espinaca y *Alnus incana*). Estas secuencias fueron comparadas para determinar la región más conservada y diseñar en esas regiones los iniciadores, como se indica en la figura 3B. Cuando una muestra de DNA era analizada con este PCR control y no se obtenía un resultado positivo, este resultado negativo podía indicar tres cosas: 1) no hay suficiente DNA presente en la muestra; 2) el DNA en la muestra está contaminado y se produce una inhibición de la reacción de PCR; y 3) la concentración de DNA es muy alta y, por lo tanto, también hay inhibición de la reacción de PCR.

Los iniciadores diseñados se probaron con muestras de DNA de tejido vegetal (figura 3a). Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación para el gen 16S en tejido fresco, se procedió a analizar el DNA obtenido de productos procesados (figura 3b). Una forma de confirmar que la secuencia amplificada sea la correcta es a través de un análisis de restricción (corte con enzimas de restricción con sitios conocidos en el fragmento amplificado). En el caso del 16S, la secuencia tiene dos sitios *Sty* I que genera tres fragmentos del producto amplificado. Dos de los fragmentos pueden ser observados en un gel de agarosa al 2%; el otro fragmento es más pequeño (16 pb), por lo que no es posible visualizarlo (figura 3c).

Una vez que se validaron los iniciadores que amplifican el gen 16S ribosomal y que se comprobó que las muestras de DNA tienen la calidad suficiente para ser analizadas, se procedió a estandarizar la detección del p35S y del tNOS.

Para llevar a cabo la estandarización de PCR del p35S y de tNOS, se evaluaron trabajos previos de detección de transgenes (Lipp *et al.*, 1999) que ya han sido validados en la Unión Europea. Esta decisión estuvo basada en la experiencia de que los resultados de un laboratorio serán más fácilmente aceptables si están realizados con protocolos que ya han sido aprobados por otras agencias. Es decir, la homogenización

de protocolos es un factor decisivo para la aceptación internacional de los resultados de detección (Acatzi *et al.*, 2014; SanJúan-Badillo *et al.*, 2014). Para la detección del promotor 35S se tomaron como base dos pares de iniciadores diseñados para la amplificación de dos segmentos del p35S con un tamaño de 195 pb y 123 pb, respectivamente (p35S195 y p35S123). El tamaño del fragmento amplificado se utiliza para denominar el protocolo. Paralelamente se diseñaron dos pares de iniciadores para amplificar fragmentos del tNOS nombrados de manera similar 118 y 176 con base en el tamaño del fragmento amplificado (tNOS118 y tNOS176).

Los pares de iniciadores para el p35S y el tNOS fueron diseñados de tal manera que amplifican regiones diferentes de dichos elementos como se muestra en la figura 2, de manera que cada par puede ser utilizado para corroborar la amplificación del otro par, sin problemas de contaminación cruzada.

Se probaron los iniciadores analizando DNA de tejido vegetal de coliflor infectada con el virus CaMV y de tejido de plantas de tabaco y papa transgénicas (figura 4a).

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación del promotor y del terminador, se procedió a detectar estos transgenes en productos procesados y comercializados, usando los oligos 35S195. Se analizaron frituras de papa, extruidos de maíz (Zucartas), papas fritas (Pringles), harinas de maíz (Maseca), almidón de maíz (Maizena), alimento de pollo y fruta para bebé (Gerber), polenta de maíz proveniente de Argentina, harina de trigo, harina de maíz (sin marca), alimento de soya (AdeS), maíz blanco enlatado de importación 35S positivo y DNA de maíz no GM. Los resultados se muestran en la figura 4b, donde se observa que los productos que contienen maíz y soya son positivos a 35S, excepto aquéllos donde la etiqueta marcaba libre de transgénicos. En la figura 4c se muestra la detección del p35S y del tNOS de DNA obtenido de alimento de soya (AdeS).

Una de las formas para confirmar el resultado obtenido por medio de PCR es la hibridación tipo Southern no radiactiva, que es una técnica muy sensible cuando el gen a detectar ha sido amplificado varias miles de veces.

Para comprobar la identidad de algunas de estas amplificaciones, se utilizaron los oligos 35S123 que amplifican una región diferente del promotor. Estas amplificaciones fueron hibridadas con una sonda que contiene la versión doble 35S obtenida del plásmido pCambia 2300 marcada con fluoresceína (figura 4c, d).

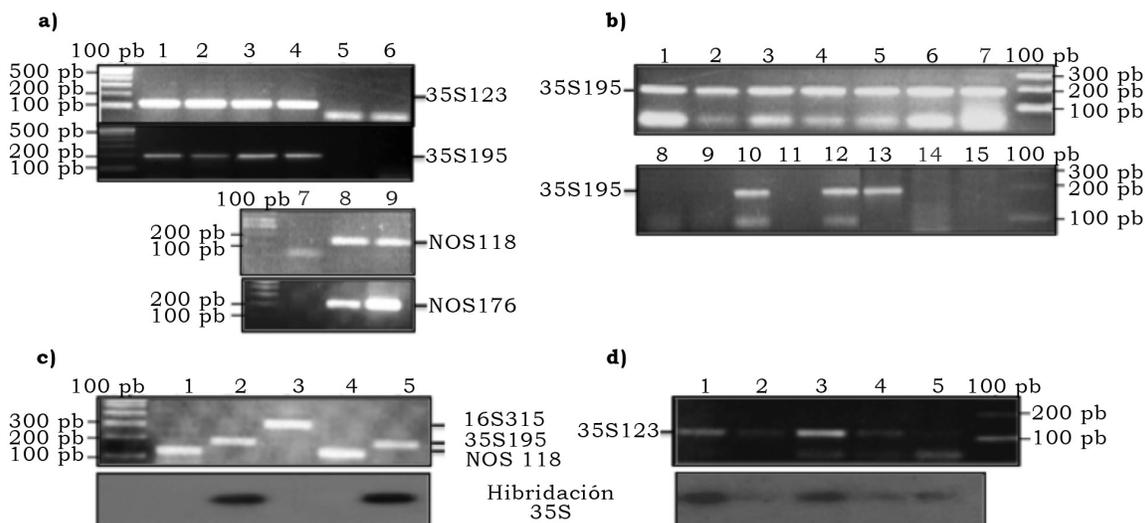


Figura 4. Amplificación del promotor 35S y del terminador NOS. a) Estandarización de amplificación usando DNA de referencia como controles positivos y negativos. 1, tabaco transformado con el plásmido PGVXYLRV; 2, coliflor infectada con el virus del mosaico de la coliflor (CaMV); 3, papa transformada con el plásmido pMON X; 4, plásmido PBI121; 5, control negativo agua; 6, control negativo DNA de tabaco Xanthi nc; 7, DNA de coliflor infectada con CaMV como control negativo; 8, DNA de tabaco transformado con el plásmido PGVXYLRV; 9, DNA de papa transformada con el plásmido pMONX. b) Amplificaciones del 35S 195 en productos varios. 1, frituras de papa; 2, extruidos de maíz (Zucaritas); 3, papas fritas (Pringles); 4, harinas de maíz (Maseca); 5, almidón de maíz (Maizena); 6, Alimento de pollo para bebé (Gerber); 7, polenta de maíz (Argentina); 8, alimento de pera para bebé (Gerber); 9, harina de trigo; 10, harina de maíz (sin marca); 11, control negativo agua; 12, control positivo DNA tabaco transformado con plásmido PGVXYLRV; 13, DNA de maíz blanco enlatado de importación 35S positivo; 14, control negativo DNA maíz no GM; 15, control negativo sin DNA. c) Amplificación del 35S, ter NOS, y 16S, en alimento líquido de soya. 1, NOS118; 2, 35S195; 3, 16S 315; 4, control positivo DNA plasmídico con NOS118; 5, control positivo DNA tabaco con 35S195. Se muestra la hibridación del producto de las amplificaciones 35S195 de muestras de alimento líquido de soya con sonda 35S. d) Hibridación de la amplificación 35S123 para diferentes muestras. 1 y 2, DNA de frituras de papa; 3, amplificación de DNA de tabaco transformado con el plásmido PGVXYLRV; 4 y 5, DNA de harina de maíz (Maseca). La sonda utilizada fue obtenida del plásmido pCambia 2300. Se hizo una restricción con las enzimas *Hind* III y *Bgl* II para obtener el promotor doble 35S. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder de Invitrogen.

Fuente: Elaboración propia.

Estandarización de PCR para la detección de los genes de NPT II y *bla*

Se diseñaron iniciadores a partir de la secuencia de los genes β -lactamasa y neomicina fosfotransferasa (NPT II), como se observa en la figura 5. Los iniciadores NPT 615 y *bla* 233 fueron inicialmente probados con DNA de plantas de chile y jitomate transformadas con un plásmido que contenía el gen de selección de neomicina fosfotransferasa II, NPTII y con callos de papa-ya transgénicos (vector con genes *bar* y β -lactamasa) (Cabrera-Ponce, Vegas & Herrera-Estrella, 1995), proporcionados por la Q.B.P. Rosa María Rangel Cano y el Dr. José Luis Cabrera Ponce, respectivamente, del Laboratorio de Transformación Genética de Plantas del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (Cinvestav) Irapuato.

Para corroborar las amplificaciones del gen de β -lactamasa, se hizo un corte con la enzima de restricción *Hae* III que divide al fragmento en tres segmentos de 49 pb, 80 pb y 103 pb, respectivamente (figura 5);

también se cortó la amplificación para NPT II con la enzima de restricción *Nco* I que divide al fragmento amplificado en dos segmentos uno de 505 pb y otro de 110 pb (figura 5b).

Determinación de límites de sensibilidad en PCR para DNA genómico y plasmídico

En la detección de transgenes por medio de la técnica de PCR es importante conocer los límites de detección. Para la determinación de los límites de sensibilidad se hicieron diluciones seriadas de DNA de planta de algodón transgénica obtenido por el método de DNazol modificado. Se tomaron 20 μ g de DNA y se diluyó con agua desionizada estéril, quedando a la mitad de concentración original (dilución 1:1). De esa primera dilución se realizaron diluciones seriadas como se muestra en la figura 6a. A cada dilución, incluyendo el DNA no diluido, se le realizó la prueba de PCR para la detección del promotor 35S195.

Los resultados fueron los siguientes: la amplificación observada fue inversamente proporcional con el número de diluciones, es decir, la intensidad de la banda observada disminuyó hasta desaparecer, mientras más grande fue la dilución y la cantidad de iniciadores observados fue aumentando, ya que mientras menor cantidad de DNA los iniciadores no utilizados

en la polimerización es mayor (figura 6b). El resultado fue que el límite de sensibilidad máximo para obtener una amplificación por PCR convencional es de 5 µg, y el mínimo es de 0.04 ng de DNA total de planta transgénica. Los mismos resultados fueron obtenidos con muestras de DNA de diferentes plantas como de maíz, papa y algodón.

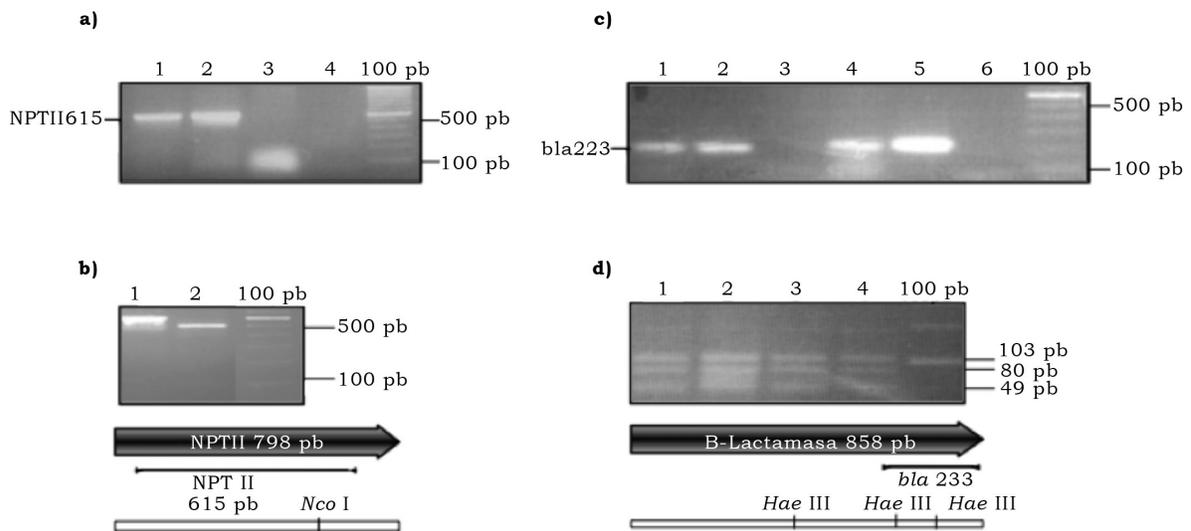


Figura 5. Amplificación del gen de NPTII615 y *bla233* en DNA vegetal. a) Carril 1, Chile variedad Sonora Anaheim transformado por *A. tumefaciens* con el plásmido PGVXYLRV; 2, jitomate UC82B transformado por *A. tumefaciens* con el plásmido PGVXYLRV; 3, DNA papa no GM; 4, control negativo agua. b) Corte de la amplificación de NPT II con la enzima de restricción *Nco*I. 1, corte de la amplificación de DNA de Chile transformado con el plásmido PGVXYLRV; 2, corte de la amplificación de DNA de Chile PGVXYLRV. Se muestra el esquema de los sitios de restricción *Nco*I y la región amplificada por los primers NPTII. c) Amplificación del gen *bla*. 1 y 2, DNA de callos de papaya transformada con un plásmido de resistencia a herbicida; 3, control maíz no GM; 4, hoja de maíz transgénico; 5, plásmido positivo para *bla*; 6, control negativo agua. d) Restricción del fragmento amplificado de *bla* con la enzima *Hae* III. 1, amplificación de DNA de callo de papaya; 2, plásmido PGVXYLRV; 3, DNA de callo de papaya; 4, DNA de Harina de maíz (Maseca). Se muestra el esquema de los sitios de restricción *Hae* III y la región amplificada por los primers *bla233*. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular 100pb de Invitrogen.

Fuente: Elaboración propia.

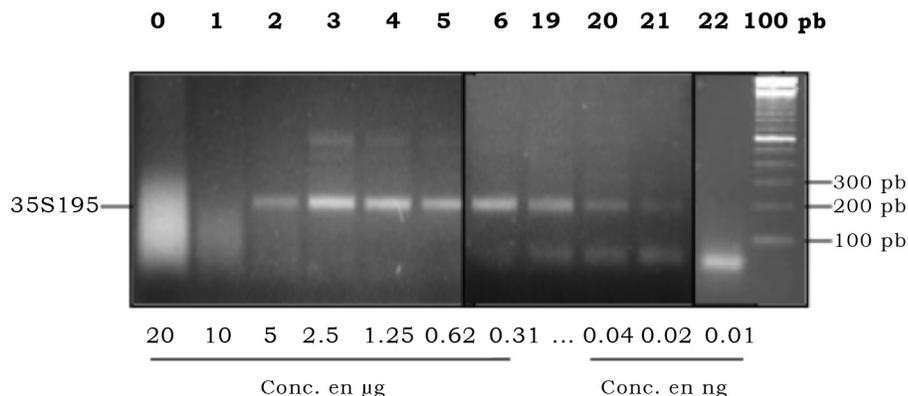


Figura 6. Amplificación del p35S195 en las diluciones de DNA obtenido de plantas de algodón transgénico. Se muestra el número de dilución y la concentración de DNA utilizada en cada amplificación. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb de Invitrogen.

Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

Este trabajo se basó en la necesidad de ofrecer metodologías validadas para la detección de OGM. El diseño experimental se basó en las siguientes premisas: *a)* los protocolos deben de ser lo suficientemente flexibles para evaluar tanto OGM (plantas, semillas, etc.) como sus subproductos (por ejemplo alimentos procesados); *b)* los protocolos deben ser útiles para el mayor número de OGM posible, es decir, abarcar la mayoría de los OGM disponibles en el mercado nacional o regional; *c)* al protocolo experimental debe ser fácilmente reproducible en los diferentes laboratorios interesados, por lo tanto, se preferirá usar reactivos (por ejemplo estuches o *kits*) ampliamente disponibles de manera comercial (y de ser posible de bajo costo) para facilitar la estandarización al mantener un control de calidad homogéneo; *d)* utilizar en lo posible metodologías (por ejemplo, PCR, elementos genéticos a detectar) o diseños experimentales (secuencias de oligos) que ya hayan sido aprobadas o validadas por organismos internacionales para que los resultados sean fácilmente aceptables de manera universal.

Otra premisa importante fue el hecho que es prácticamente imposible establecer un método único que detecte todos los OGM, por lo que fue necesario establecer metodologías casi universales basadas en los elementos genéticos presentes en la primera generación de OGM. Por otro lado, el trabajo trató de establecer los protocolos de detección similares para OGM y sus subproductos, aunque proponiendo modificaciones específicas en aspectos puntuales como los protocolos de extracción de DNA.

Para la extracción de DNA se seleccionó la solución comercial *Plant DNAzol* que se utiliza específicamente para extracción de DNA de tejido vegetal. El hecho de utilizar soluciones comerciales fue con el fin de disminuir al máximo posibles variables que pueden afectar los resultados de la obtención de DNA.

Como se mencionó en los resultados, la extracción de DNA y la técnica de PCR están estrechamente relacionadas, pues si la extracción de DNA no es adecuada, los contaminantes presentes en la solución de DNA inhibirán el análisis por PCR. Dentro de los inhibidores más comunes se encuentran colorantes (ejemplo, la clorofila en tejido vegetal), proteínas tanto nativas (provenientes del mismo OGM) como las adicionadas al producto en el caso de alimentos procesados. Cabe mencionar que en el caso de estos productos la diversidad de los procesos de manufactura (cocción, secado, freído, extrusión, etc.) y el agregado de aditivos (sales, carbohidratos, en-

zimas) genera igualmente una gran diversidad en los productos finales con la consecuente variabilidad en los resultados en la extracción del DNA de calidad por la presencia de inhibidores.

El estuche reactivo seleccionado, *DNAzol*, tiene la característica de tener una sola solución reguladora en el *kit*, en comparación con otros que tienen dos o más, lo que facilita su uso, no tiene que incubarse a temperaturas mayores o menores a la del ambiente. En el caso de algunas muestras de alimentos procesados se requirió una modificación. Originalmente, el método recomienda utilizar un solo lavado con cloroformo si la muestra va a ser utilizada para PCR. Cuando el resultado con el PCR de control de calidad previo no fue el adecuado, se hicieron lavados (extracciones) adicionales con fenol para eliminar los contaminantes (principalmente proteínas). Como el fenol es también un gran inhibidor del ensayo PCR, éste fue eliminado con extracciones adicionales con cloroformo, solvente que arrastra consigo el fenol remanente de la muestra con base en sus propiedades de molécula no polar. Posteriormente, el DNA fue precipitado con isopropanol 100% que ayuda a la eliminación del cloroformo. Estas modificaciones al método *DNAzol* produjeron los mejores resultados.

Los otros métodos probados, *Phytopure* y otro basado en urea, fueron igualmente modificados. Aunque los resultados con los métodos adicionales fueron ligeramente inferiores al *DNAzol*, los protocolos se reportan de modo paralelo como una alternativa en situaciones especiales (por ejemplo en diferentes tipos de muestras a las probadas aquí) en las que el *DNAzol* resultará inadecuado.

Hay algunos reportes que mencionan *kits* de extracción de DNA, como el caso de Vollenhofer *et al.* (1999), quienes utilizan *Dneasy Plant Mini Kit* (Quiagen), en el cual se necesitan columnas de purificación de DNA. Este *kit* tiene la ventaja de que no utiliza solventes orgánicos para eliminar proteínas de la muestra, pero la cantidad de DNA obtenido es menor (3 µg/100 mg - 7 µg/100 mg de tejido). En cambio, con la solución *DNAzol* la cantidad obtenida es de 7 µg/100 mg - 11 µg/100 mg de tejido vegetal. Vařtilingom *et al.* (1999) reportan algunas modificaciones al método de Köppel, Stadtler, Lüthy & Hübner (1997), basado en el uso de columnas de purificación. Zimmermann *et al.* (2000) realizan extracciones de DNA por el método de Nucleon® *Phytopure* que utiliza una resina, pero no utiliza columnas de purificación. Otros reportes también mencionan diferentes métodos de extracción con numerosos pasos e incubaciones que alargan el proceso y dificultan su elaboración, y son más costosos.

Con base en los resultados de experimentos llevados a cabo se puede decir que se cuenta ya con un protocolo estandarizado que consta de bajo número de pasos para su elaboración, además de ser relativamente barato, y que puede ser utilizado para extracciones de diversas muestras.

Para la estandarización de la técnica de PCR se tomaron como referencia algunas metodologías ya diseñadas y validadas por algunos grupos europeos. Lipp *et al.* (1999) diseñaron dos pares de iniciadores para detectar el p35S y otros dos para el tNOS. En los resultados reportados aquí, el par 35S 195 y el par Nos118 mostraron una mayor sensibilidad de detección, es decir, bandas más intensas en la electroforesis en agarosa. Estos datos coinciden con los resultados reportados previamente (Lipp *et al.*, 1999). Los otros dos pares, 35S 123 y NOS 176, aunque son aparentemente menos sensibles, fueron también utilizados para la corroboración de las amplificaciones hechas por el 195 y 118, ya que amplifican diferente segmento de los genes. Este tipo de controles internos es importante para descartar posibles contaminaciones con el producto de amplificación de ensayos anteriores, principal problema en los laboratorios de diagnóstico.

Las concentraciones de los reactivos varían según el fabricante. En este trabajo fueron utilizados dos marcas registradas: *Invitrogen* y *Roche*. Cada fabricante tiene recomendaciones específicas sobre las cantidades para cada uno de los reactivos. Estas concentraciones pueden variar según las necesidades específicas del ensayo en cuestión. Por ejemplo, generalmente los fabricantes recomiendan volúmenes de reacción de 50 μ l. En el protocolo establecido aquí se muestra que el ensayo se puede reducir a un volumen de 25 μ l sin afectar la eficiencia o confiabilidad del ensayo. Otros autores han reportado igualmente reacciones con volúmenes similares (Matsuoka *et al.*, 2000).

Como en todos los análisis, es indispensable incluir los controles necesarios para garantizar que el ensayo es confiable y preciso. En el protocolo estandarizado aquí se utilizaron plásmidos que tuvieran insertado el gen específico por analizar para verificar constantemente la funcionalidad del ensayo y el tamaño adecuado del producto esperado. También se utilizó DNA de plantas transgénicas para indicar que los iniciadores fueran capaces de amplificar secuencia insertadas en un genoma más complejo. Como control negativo se utilizó DNA de plantas no transgénicas para indicar que los iniciadores no amplificaran erróneamente un fragmento del genoma de la planta por analizar. Finalmente, un control adicional pero igual-

mente importante es el que utiliza agua en lugar de la solución de DNA. Este control es muy importante para descartar que los reactivos estuviesen contaminados (generalmente con el mismo producto de DNA de reacciones anteriores) y que generase una amplificación inesperada (falso positivo).

Como se mencionó arriba, en el caso de las muestras de alimentos procesados resultó necesario verificar previamente la calidad del DNA extraído. Esto fue realizado con una reacción de PCR previa que indique la calidad de la muestra. El fragmento seleccionado para amplificar en este ensayo previo fue el DNA ribosomal 16S, un gen altamente conservado por lo que el mismo juego de oligos se puede usar con muchas especies vegetales.

Teniendo en cuenta los requerimientos para llevar a cabo las amplificaciones, se procedió al análisis de las muestras de alimentos procesados. Se seleccionaron principalmente muestras de alimentos conteniendo productos de maíz por varias razones. Por un lado, es el caso más controversial en la actualidad debido a la importancia sociocultural y económica de este cultivo en México, incluyendo su centro de origen y de diversidad. Por otro lado, desde hace varios años se ha estado importando maíz y productos alimenticios conteniendo sus derivados. Estos productos generalmente provienen de Estados Unidos de América, uno de los principales productores de maíz GM. Por otro lado, la gran diversidad de los productos hechos con base en maíz presentaba una gran diversidad también en el tipo de muestras a analizar. También fueron analizados algunos productos de papa, especie modificada genéticamente desde hace varios años.

Confirmando lo antes mencionado, en algunos productos analizados como harinas, extruidos y enlatados de maíz, así como en productos de papa y soya, fueron encontradas secuencias nucleotídicas del p35S y del tNOS. Esto demuestra que productos transgénicos están siendo introducidos y consumidos en nuestro país a través de productos de importación. Es muy importante mencionar que todos los productos de importación que contienen OGM han sido aceptados para el consumo humano por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) y generalmente también por la Secretaría de Salud en México. Estos resultados fueron confirmados por medio de hibridaciones tipo *Southern* no radiactiva y en algunos casos por medio de secuenciaciones de los productos de amplificación de las reacciones de PCR confirmando la validez de los protocolos aquí reportados.

Después de estandarizar la técnica de PCR y de confirmar su confiabilidad, se procedió a analizar los límites de sensibilidad del ensayo. Los límites se establecieron de acuerdo con los resultados visibles en geles de agarosa utilizando una serie de diluciones de concentración conocida del DNA del transgén a analizar. Es decir, cada dilución fue analizada por espectrofotómetro para medir la cantidad de DNA presente en la dilución, y las amplificaciones se observaron en geles de agarosa al 2%. Los resultados obtenidos oscilan entre 5 µg y 40 pg. Estos resultados con DNA de maíz GM difieren con los reportados por Ahmed (2002) (10 ng - 20 pg), usando DNA de arabidopsis. Existen varias razones para este tipo de discrepancias. Por un lado, es claro que el tamaño del genoma de la planta GM utilizada puede ser muy importante. El genoma de maíz es veinte veces más grande que el de arabidopsis, por lo tanto una copia de un transgén en cada uno de esos genomas representa un porcentaje muy diferente con relación al DNA total. Por otro lado, el número de copias del transgén en un OGM puede variar. Esto hace que sea difícil comparar límites de sensibilidad usando especies y eventos de OGM diferentes. De cualquier manera, la sensibilidad obtenida en los protocolos establecidos aquí es suficientemente adecuada para la mayoría de los ensayos que se requieren para la determinación de la presencia de OGM.

CONCLUSIONES

Se cuenta con tres métodos establecidos para la extracción de DNA de muestras vegetales y de productos procesados: DNazol modificado, *Phytopure* modificado y urea modificado. De los tres métodos evaluados para la extracción de DNA tanto en muestras vegetales como en productos procesados, el DNazol modificado fue en el que se obtuvieron mejores resultados. Se tiene estandarizada la técnica de PCR para la detección del promotor 35S, del terminador NOS, los genes *bla*, NPT II y 16S ribosomal. Los iniciadores diseñados para las amplificaciones del 35S, tNOS, gen β-lactamasa y NPT II son adecuados y pueden ser empleados con las mismas condiciones de corrida para facilitar la amplificación al mismo tiempo de uno o varios de los transgenes. Los límites de sensibilidad para la detección de los diferentes transgenes oscilan entre 5 µg y 0.04 ng. Las técnicas modificadas en este trabajo son confiables para ser utilizadas en la detección de OGM en alimentos procesados, así como en tejido vegetal.

REFERENCIAS

- Acatzi, A., Gálvez, A., Plasencia, J. & Quirasco, M. (2014). Assessment of DNA extraction methods for GMO analysis for grain monitoring in México. Part II: quantification by real-time PCR. *Agrociencia*, 48(1), 35-52.
- Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N. A. & F. Al-Qurainy, F. (2012). Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances*, 30(3), 524-540.
- Ahmed, F. E. (1995). Application molecular biology to biomedicine and toxicology. *Journal of Environmental Science and Health*, 11(1), 1-15.
- Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20(5), 215-223.
- Álvarez-Morales, A., Bohorova, N., Castillo, G. F., Dirzo, M. R., Equihua, Z. M., Gálvez, M. A., Garzón-Tiznado, J. A., González A. R. L., Larqué, S., A., Larson, G. J., López, H. A., Loyola, V. V., Martínez, V. G., Nieto, J., Vázquez, M. L., Paredes, O., Piñero, D. D., Sarukhán, K. J., von Scheven, C. E., Solleiro, R. J. L., & Serratos, H. J. A. (1999). Organismos vivos modificados en la agricultura mexicana: desarrollo biotecnológico y conservación de la diversidad biológica. *Biotecnología*, 4(2), 47-60.
- Álvarez-Morales, R. A., Jofre y Garfias, A., & Trejo-Saavedra, D. L. (2008). Detección de organismos genéticamente modificados. En *Bioseguridad en la aplicación de la biotecnología y el uso de los organismos genéticamente modificados* (pp. 209-218). México: Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (Cibiogem).
- Brookes, G., & Barfoot, P. (2014). *GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2012*. PG Economics Ltd. Dorchester, UK. Recuperado el 3 de octubre de 2014 de <http://pgeconomics.co.uk>
- Cabello, J. V., Lodeyro, A. F., & Zurbriggen, M. D. (2014). Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 62-70.
- Cabrera-Ponce, J. L., Vegas, G. A., & Herrera-Estrella, L. (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports*, 15(1-2), 1-7.
- Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (Cibiogem) (2012). *Red Mexicana de Monitoreo de Organismos Genéticamente Modificados*. Recuperado el 18 de octubre 2012 de <http://www.cibiogem.gob.mx/redes/RedMexOGMs/> Paginas/inicio.aspx
- Cruz, A. (16 de agosto de 2002). Frena biotecnología uso de pesticidas. *El Periódico Reforma*. Sección Ciencia. Recuperado el 16 de agosto de 2002 de <http://www.reforma.com>
- Dieffenbach, C. W., & Dveksler, G. S. (1995). *PCR Primer: A laboratory manual* (pp. 1-83). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Genetically Modified Plants (GMO) Compass (2010). *Genetically modified plants: Global Cultivation Area. Maize*. Recuperado el 13 de octubre de 2013 de http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/341_genetically_modified_maize_global_area_under_cultivation.html

- Gupta, A. (2000). Governing trade in genetically modified organism. The Cartagena Protocol on Biosafety. *Environment*, 42(4), 22-23. doi: 10.1080/00139150009604881.
- Hassler, S. (1999). Four views from cartagena. *Nature biotechnology*, 17(6), 512-516.
- Huang, H., Cheng, F., Wang, R., Zhang, D., & Yang, L. (2013). Evaluation of four endogenous reference genes and their real-time PCR assays for common wheat quantification in GMOs detection. *PLoS*, 8(9), e75850. doi: 10.1371/journal.pone.0075850
- James, C. (2013). Global Status of Comercialized Biotech/GM Crops. *ISAAA Brief No. 46*, ISAAA: Ithaca, NY.
- Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., & Hübner, P. (1997). Sensitive nachweismethode für die gentechnisch veränderte sojabohne "Roundup Ready". *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 88, 164-175.
- Ley Mexicana de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) (2005). México: Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Secretaría General, Secretaría de Servicios Parlamentarios, Centro de Documentación, Información y Análisis. Recuperado en octubre de 2013 de <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf>
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., & Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a methos to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists International*, 82(4), 923-928.
- Matsuoka, T., Kuribara, H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiky, K., Toyoda, M., & Hino, A. (2000). A multiplex PCR Meted of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 42(1), 24-32.
- Reglamento de la Ley Mexicana de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) (2009). México: Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Secretaría General, Secretaría de Servicios Parlamentarios, Centro de Documentación, Información y Análisis. Recuperado en octubre de 2013 de <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regla.htm>
- Sambrook, J., & Russel, D. (2000). *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (3rd end). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SanJúan-Badillo, A., Gálvez, A., Plasencia, J., & Quirasco, M. (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. *Agrociencia*, 48(1), 17-33.
- Schreiber, G. A. (1999). Challenges for methods to detect genetically modified DNA in Foods. *Food control*, 10(6), 351-352.
- Shure, M., Wessler, S., & Fedoroff, N. (1983). Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell*, 35(1), 225-233.
- Trejo-Saavedra, D. L. (2000). *Establecimiento de un sistema de regeneración de plantas de jitomate (Lycopersicon esculentum L.) vía de cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la transformación genética de plantas* (tesis de Ingeniería en Alimentos). Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato: México.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2012). *Foreign Agricultural Service. Corn: Area, Yield, and Production*. Recuperado el 13 de octubre de 2013 <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=884&hidReportRetrievalTemplateID=1>
- Vařtilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F., & Brignon, P. (1999). Real-Time Quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in some representative foods. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5261-5266.
- Varshney, R. K., Bansal, K. C., Aggarwal, P. K., Datta, S. K., & Craufurd, P. Q. (2011). Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: Hope or Hype? *Trends in Plant Science*, 16(17), 363-371.
- Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J., & Kroath, H. (1999). Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5038-5043.
- Wintermantel, W. M., & Schoeetz, J. E. (1996). Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology*, 223(1), 156-164.
- Wolfenbarger, L. L., & Phifer, P. R. (2000). The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 290(15), 2088-2093.
- Yates, K. (1999). Series Editor. International Life Sciences Institute (ILSI). ILSI Europe Report Series. ILSI Europe Press: Brussels, Belgium.
- Zimmermann, A. Luthy, J., & Pauli, U. (2000). Event-specific transgene detection in Bt11 Corn by Quantitative PCR at the integration site. *Lebensmittel-Wissenschaft Uud-Technologie*, 33(3), 210-216.