

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Estandarización de un Protocolo para Detección de OGMs: Evaluación de la
Presencia de OGMs en Granos de Soya Colectados en Diferentes Centros de Acopio
de Ecuador.**

María Lorena Mejía Castañeda

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Licenciatura en
Biotecnología

Cumbayá, Mayo 2011

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Estandarización de Protocolo para Detección de OGMs: Evaluación de la Presencia de OGMs en Granos de Soya Colectados en diferentes centros de acopio de Ecuador.

María Lorena Mejía Castañeda

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Directora del Proyecto

Venancio Arahana, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Germán Romo, Dr.
Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph. D.
Decana del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, Mayo del 2011

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de Autor

María Lorena Mejía Castañeda

2011

Dedicatoria

A mis padres y hermanos por la incondicionalidad.

Sin ellos lo logrado, habría sido más difícil de conseguir.

Su fuerza, tenacidad y lucha constante los ha convertido en el gran modelo a seguir.

A ellos este trabajo por ser mi apoyo eterno.

Agradecimiento

A Lorena Castañeda y Jairo Mejía porque me dieron la vida y me enseñaron a amarla y respetarla, por su esfuerzo y dedicación incansable.
A Jorge y Jairo por nunca dudar de mí. A más de ser hermanos, son mis amigos.

A mis amigos y amigas por las experiencias y enseñanzas a lo largo de tantos años.

Mis más sinceros agradecimientos a Lourdes Torres y Venancio Arahana, quienes a lo largo de este tiempo han puesto a mi disposición sus capacidades y recomendaciones.

Gracias por el apoyo constante y los conocimientos transferidos.

Resumen

La soya es un cultivo cuya producción nacional no es suficiente para suplir la demanda nacional, por lo que se importa semilla de soya para siembra y soya en grano para consumo de países donde se ha aprobado el uso de soya transgénica, de modo que existe la probabilidad del ingreso de este cultivo al territorio ecuatoriano.

En la presente investigación, un método de detección y cuantificación de soya genéticamente modificada con tecnología SYBR Green en el termociclador *CFX96* Bio-Rad fue estandarizado. Los primers utilizados para la amplificación correspondieron a secuencias específicas de los dos elementos recombinantes más representativos en cultivos genéticamente modificados, el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (P35S) y el terminador NOS del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (TNOS), generando amplicones de 200pb y de 69pb respectivamente. Los parámetros a los cuáles se obtuvo los resultados deseados fueron 100ng de ADN de soya para la amplificación y 58°C para el anclaje de los primers P35S y 55°C para el anclaje de los primers TNOS.

El análisis cuantitativo se realizó a partir de la generación de una curva estándar en base a la amplificación de los primers mencionados en material de referencia certificado con concentraciones de 0.01%, 0.1%, 1% y 10% de soya transgénica del evento GTS 40-3-2. El límite de detección se estableció en 0.01%, mientras que el límite de cuantificación fue establecido en 0.1%. Aproximadamente el 7.7% (2/26) de las muestras de soya en granos contienen más del 0.1% de OGM. Se verificó, además, presencia adventicia en varias muestras de soya en grano analizadas.

Debido a las regulaciones de OGMs que se contemplan en el Ecuador, este tipo de análisis es importante para confirmar que OGM están presentes en el territorio ecuatoriano y evidencia la necesidad de contar con personal capacitado e instituciones especializadas en la detección y análisis de organismos genéticamente modificados.

Abstract

Soybean is a crop with a national production which is insufficient to meet its demand; therefore soybean seeds and soya beans are imported from countries where the use of transgenic soybean has been already approved, hence there is the probability that in Ecuador we can find this type of soybean.

In this research, a detection and quantification SYBR Green-based method of genetically modified soybean in thermal cycler CFX96 Bio-Rad has been standardized. Primers used for the amplification corresponded to specific sequences of the two most representative recombinant elements in GM crops. The 35S promoter from the Cauliflower Mosaic Virus (P35S) and NOS terminator from Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* (TNOS) generated 200bp and 69bp amplicons respectively. The parameters by which the desired results were obtained were 100ng of soybean DNA for the amplification step and 58°C for the annealing temperature of P35S primers and 55°C for TNOS primers.

The quantitative analysis was performed once a standard curve based on the amplification of the above mentioned primers was generated using certified reference materials with 0.01%, 0.1%, 1% y 10% of GM soybean event GTS 40-3-2. The detection limit was set at 0.01% while the quantification limit was set at 0.1%. Approximately 7.7% (2/26) of soybean samples contained more than 0.1% of GMOs. Additionally, adventitious GMO presence was verified in several soybean samples.

Due to Ecuadorian GMOs regulations, this kind of analysis has to be established in order to determine if GMOs are present in Ecuador; and makes clear the need of trained personnel and specialized institutions for GMO detection and analysis.

Tabla de Contenidos

1. Introducción	1
1.1 Organismos genéticamente modificados. Impacto en la producción. Controversias.	1
1.2 Situación global de cultivos transgénicos	4
1.3 El Protocolo de Cartagena	4
1.4 Situación en Latino América de cultivos transgénicos	5
1.5 Situación de cultivos transgénicos en Ecuador	6
1.6 Situación de soya en el Ecuador	7
1.7 Métodos de detección	9
1.8 PCR en tiempo real	11
2. Justificación	15
3. Objetivo General	15
4. Objetivos Específicos	16
5. Área de Trabajo	16
6. Materiales	16
6.1 Procesamiento y molienda de muestras	16
6.2 Extracción, cuantificación y dilución de ADN	17
6.3 Amplificación mediante PCR en punto final	17
6.4 Detección y Cuantificación mediante PCR en tiempo real	18
7. Metodología	19
7.1 Obtención de muestras.	19

7.2	Preparación de muestras.	20
7.2.1	Limpieza	20
7.2.2	Molienda.	20
7.3	Procesamiento de ADN	20
7.3.1	Extracción de ADN.	20
7.3.2	Cuantificación de ADN	21
7.3.3	Dilución de ADN	21
7.4	Amplificación mediante PCR en punto final	21
7.5	Detección y Cuantificación mediante la amplificación por PCR en Tiempo Real	23
8.	Resultados	24
8.1	Obtención, preparación y molienda de muestras.	24
8.2	Extracción y Cuantificación de ADN.	25
8.3	Detección mediante PCR en punto final	25
8.4	Detección y Cuantificación mediante PCR en Tiempo Real	26
9.	Discusión	28
9.1	Obtención, preparación y molienda de muestras.	28
9.2	Extracción y Cuantificación de ADN.	29
9.3	Detección de soya genéticamente modificada mediante PCR	30
10.	Conclusiones	39
11.	Recomendaciones	40
12.	Bibliografía	42
13.	Tablas	50

14. Figuras	53
15. Anexos	57
Anexo 1. Área Global de Cultivos Transgénicos de 2010: por país (millones de hectáreas)	57
Anexo 2. Lista de países donde se han realizado aprobaciones regulatorios del evento GTS 40-3-2.	58
Anexo 3. Lista de eventos de soya en el mundo y presencia de P35S y TNOS	59

Índice de Figuras y Tablas

Tabla 1. Lista de muestras de semillas de soya, soya en grano y pasta de soya analizadas	50
Tabla 2. Primers utilizados en esta investigación para la amplificación de P35S y TNOS y tamaño de amplicones.	50
Tabla 3. Concentraciones Reacción PCR Promotor 35S	51
Tabla 4. Concentraciones Reacción Terminador NOS	51
Tabla 5. Cuantificación de ADN de muestras analizadas. El número de muestras corresponde al número de muestras de la Tabla 1.	52
Figura 1. Resultados de amplificación del promotor 35S mediante PCR en punto final. Tamaño de amplicón de 200pb. Muestras positivas: Control positivo, muestra 22 y muestra 23. (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).	53
Figura 2. Resultados de amplificación del terminador NOS mediante PCR en punto final. Tamaño de amplicón de 69pb. Muestras positivas: Control positivo, muestra 22 y muestra 23. (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).	53
Figura 3. Curvas de Amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. C+, muestra 23, muestras estándares con 10%, 1% y 0.1% de soya GM y muestra 22 son las muestras con cantidad de producto amplificado detectable y cuantificable. (RFU = Unidades de Fluorescencia)	54

- Figura 4.** Curvas de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. C+, muestra 23, muestras estándares con 10%, 1% y 0.1% de soya GM y muestra 22 son las muestras con cantidad de producto amplificado detectable y cuantificable. (RFU = Unidades de Fluorescencia) 54
- Figura 5.** Curva estándar de amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01%, 0.1%, 1% y 10%), Las X representan a las 26 muestras por duplicado 55
- Figura 6.** Curva estándar de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01%, 0.1%, 1% y 10%), Las X representan a las 26 muestras por duplicado 55
- Figura 7.** Picos de Disociación de Amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Temperatura de disociación de producto diana amplificado: 81°C. Dímeros de primer y producto inespecífico con temperaturas desde 73°C hasta 78°C. 56
- Figura 8.** Picos de Disociación de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Temperatura de disociación del producto diana amplificado: 71.5°C. Dímeros de primer con temperatura desde 64°C hasta 68°C. 56

1. Introducción

1.1 Organismos genéticamente modificados. Impacto en la producción. Controversias.

En la actualidad existen 1.02 billones de personas malnutridas en el mundo, lo que significa que casi 1/6 de toda la humanidad sufre de hambre (“More people than”, 2009). El crecimiento de las ciudades lleva a un incremento en la demanda mundial de alimentos, por lo que el reto actual es optimizar maneras de aumentar la eficiencia en la producción de alimento con el objetivo de aliviar la pobreza, el hambre y la malnutrición. Teniendo en cuenta principios ecológicos esenciales que guíen una producción agrícola sustentable y que permita una mayor disponibilidad de alimentos tanto de origen vegetal como animal, así como, mejorar los sistemas de distribución de los alimentos, se considera que la mejor estrategia para lograrlo es combinar lo mejor de la tecnología agropecuaria convencional con lo mejor de las aplicaciones agrobiotecnológicas (James, 2009). La biotecnología es una disciplina que ayuda a encontrar alternativas para generar alimentos más nutritivos, mejorar la productividad por hectárea, disminuir los costos de producción y reducir la huella ambiental de la agricultura (James, 2009).

Lamentablemente, el uso de las diversas biotecnologías modernas en la producción de alimentos (plantas y animales) ha sido objeto de un profundo debate público y político; y un gran porcentaje de estas discusiones se ha centrado principalmente en los organismos genéticamente modificados (OGMs). Estos organismos, que también son conocidos como transgénicos, pueden tener características particulares gracias a que se insertan determinados genes de otros organismos en su código genético, se delecionan o se silencian genes específicos, mediante la técnica de ADN recombinante, lo cual les confiere la característica deseada (Villalobos, 2008), tal como tolerancia a herbicida, que es la

característica dominante en los cultivos transgénicos aprobados en varios países; resistencia a insectos, entre otras (James, 2009).

En la actualidad, los reportajes de los medios de comunicación están cargados con historias y noticias sensacionalistas con una representación errónea de los aspectos reales de los organismos genéticamente modificados. Existen muchos grupos que proporcionan datos desacertados y, mediante sus distinguidas campañas publicitarias, logran llegar a la mayoría de gente con información inexacta, provocando confusión y desconcierto con respecto a los organismos genéticamente modificados. Además, varios países no permiten la investigación, experimentación, producción o importación de transgénicos a pesar de que existe información confiable con bases científicas sobre la inocuidad de los OGMs (James, 2010; Villalobos, 2009). La aceptación a estos cultivos todavía es muy limitada y refleja la necesidad de mayor información sobre ellos. Es imperiosa una campaña de concientización masiva para que se puedan abrir las puertas a estas nuevas alternativas y tecnologías alimentarias. Los alimentos transgénicos, a pesar de la gran controversia causada por su cultivo y consumo, ofrecen sustanciales beneficios económicos, ambientales y sociales; ya que son creados, principalmente, para incrementar el rendimiento en condiciones desfavorables, como altas o bajas temperaturas, sequía, plagas, malezas, etc. Además, se podrían disminuir los costos de su producción, ya que se pueden obtener alimentos más baratos y eficientes (Villalobos, 2009). Los consumidores podrán tomar las decisiones que les parezcan convenientes acerca de consumir o no alimentos transgénicos pero tienen derecho a la información veraz y oportuna para, en base a ella, sustentar sus decisiones.

El gran debate existente ha ejercido una gran imposición para que los transgénicos sean producto de una amplia y profunda evaluación científica con el objetivo de determinar potenciales riesgos a la salud humana o al medio ambiente antes de su liberación

comercial. Es importante mencionar que no existe tecnología con riesgo cero, todo descubrimiento o adelanto científico implica riesgos y, es a través del análisis y regulación, que se logra minimizarlos y capitalizar toda la potencialidad que ofrece esta nueva tecnología. “Los cultivos biotecnológicos autorizados para su comercialización producen alimentos seguros para el consumo humano y animal. Se han estudiado intensivamente y cumplen con las más estrictas normas de seguridad alimentaria” (“¿Qué es la biotecnología?”, n.f.).

Previa su salida al mercado, un transgénico debe pasar por un profundo proceso de análisis de riesgo, para garantizar que su consumo sea inocuo. Se debe evaluar las medidas y lineamientos de prevención y control, así como de mitigación y remediación de los posibles impactos adversos a la salud humana y al ambiente que pudieran ocasionar los cultivos transgénicos. Debido a que la evaluación se basa en la liberación al ambiente de un evento particular, no se pueden hacer generalizaciones, lo que implica que los análisis deben realizarse caso por caso, es decir, cada caso debe considerarse de manera independiente (Villalobos, 2008). Un evento es “una recombinación de ADN única que ha tenido lugar en una célula vegetal y que después se ha utilizado para generar plantas transgénicas enteras”. Las autoridades reguladores y los organismos internacionales proponen los nombres de los eventos como identificadores únicos para diferenciar unos de otros (James, 2009).

Han transcurrido más de 15 años desde que estos productos fueron consumidos por primera vez y no existen pruebas respaldadas científicamente de efectos adversos ni para el ambiente ni para la salud humana ni animal, derivados directamente del cultivo o consumo de los OGMs. Esto, a más de los beneficios demostrados permite afirmar que, si esta tecnología es utilizada apropiadamente, representa una alternativa, entre otras, para obtener

nuevas variedades que contribuyan a desarrollar una agricultura más sustentable y, de esta manera, mejorar la producción y disponibilidad de los alimentos.

1.2 Situación global de cultivos transgénicos

En el *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA) se puede encontrar información detallada sobre la situación mundial de la comercialización de cultivos transgénicos desde 1996 hasta el 2010. En 1996, el primer año en el que se comercializaron cultivos genéticamente modificados, fueron 6 países los que decidieron optar por esa tecnología, mientras que en la actualidad son 29 países (James, 2010). En el año 2010 se alcanzaron 148 millones de hectáreas dedicadas a la producción de cultivos biotecnológicos en varios países como Estados Unidos (66.8 millones de hectáreas), Brasil (25.4), Argentina (22.9), India (9.4), Canadá (8.8) y China (3.5), entre otros. Además, 15.4 millones de agricultores han decidido utilizar estos productos en los 29 países (Anexo 1). En total, suman 964 aprobaciones que se han concedido para 184 eventos en 24 cultivos en 59 países. El maíz es el cultivo con mayor cantidad de eventos aprobados, cuenta con 60, seguido por el algodón con 35, canola con 15, mientras que la papa y la soya tienen 14 cada uno. La soya tolerante a herbicida (evento GTS-40-3-2) es el cultivo que ha recibido aprobaciones en la mayoría de países, seguido por el maíz tolerante a herbicida (NK603) y el maíz resistente a insectos (MON810) (James, 2010).

1.3 El Protocolo de Cartagena

El Protocolo de Cartagena es el principal convenio internacional para temas relacionadas con los organismos genéticamente modificados. A más de reconocer el potencial de la biotecnología moderna, el Protocolo busca asegurar que los OGMs sean manejados, transportados y usados de una manera segura y, además, establece ciertos procedimientos para que los movimientos transfronterizos sean regulados. Recomienda que

se tenga en cuenta conocimientos especializados e instrumentos disponibles y que se tomen las medidas administrativas y legislativas necesarias para cumplir con los distintos artículos del mismo. Uno de los temas centrales del protocolo es la evaluación de riesgo para adoptar decisiones sobre organismos genéticamente modificados y para ello una metodología ineludible es la detección e identificación de OGMs. (“Protocolo de Cartagena”, 2000). El que un país forme parte de este protocolo representa una demanda de capacitación de personal y de formación de instituciones especializadas para llevar a cabo esta tarea, lo que involucra contar por lo menos con una metodología específica para la detección, identificación y cuantificación de OGMs.

Veinte y tres países latinoamericanos y del Caribe (Antigua y Barbuda, Bahamas, Barbados, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, San Cristóbal y Nevis, Suriname, Trinidad y Tobago y Venezuela) han ratificado el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (“Partes del Protocolo”, 2011) pero no todos tienen un marco regulatorio específico establecido en este tema.

1.4 Situación en Latino América de cultivos transgénicos

Diez países latinoamericanos han aprobado el cultivo de transgénicos (soya, maíz, algodón y canola) en su territorio. Brasil y Argentina, después de Estados Unidos, son los países con mayor área dedicada al cultivo de OGMs en el mundo con 25.4 y 22.9 millones de hectáreas respectivamente, por lo que lideran la producción de transgénicos en América Latina. Brasil, en el año 2010 registró un incremento de 4 millones de hectáreas dedicadas a los cultivos biotecnológicos más que en 2009. Los otros países latinoamericanos son Paraguay (2.6 millones de hectáreas), Uruguay (1.1), Bolivia (0.9), México (0.1),

Colombia, Chile, Honduras y Costa Rica con menos de 0.1 millones de hectáreas (James, 2010).

1.5 Situación de cultivos transgénicos en Ecuador

El Ecuador, a pesar de haber ratificado el Protocolo de Cartagena el 30 de enero de 2003 (“Partes en el Protocolo”, 2011), no tiene regulaciones específicas en cuestión de Bioseguridad. El Ministerio del Ambiente ha estado trabajando durante años para establecer un Marco Regulatorio sobre Seguridad de la Biotecnología y los OGMs pero hasta el momento no ha sido concluido (“Biosafety Expert”, 2009). Existen leyes ecuatorianas donde ciertos artículos establecen procedimientos sobre el manejo y etiquetado de OGMs pero ninguna de ellas se cumple en la actualidad. La ley de Defensa del Consumidor establece que los productos derivados de OGMs deben ser etiquetados de manera resaltada (Congreso Nacional, n.f.), mientras que la Ley Orgánica de Salud aclara que la Autoridad Competente del país (Ministerio del Ambiente (“Ley de Gestión Ambiental”, 1999)), deberá coordinar con organismos especializados y, con ellos, demostrar la inocuidad y seguridad de alimentos o productos GM tanto para la salud humana como para el medio ambiente, mediante estudios técnicos y científicamente avanzados (Congreso Nacional, 2006). A pesar de los esfuerzos e interés en la creación de una legislación sobre los organismos genéticamente modificados en el Ecuador, las leyes contempladas en la actualidad no son cumplidas y no existe un organismo capaz de regularlas.

Además, en el 2008 una nueva Constitución del Ecuador fue aprobada, la misma que declara al país libre de semillas y cultivos transgénicos, lo que implica la no existencia de organismos genéticamente modificados en el territorio ecuatoriano (“Constitución del Ecuador”, n.f.). Este artículo es contundente y, a la vez, tajante al aseverar que no ha ingresado semillas o cultivos transgénicos al país. Para el cumplimiento de estas

regulaciones y para asegurar la declaración de país libre de OGMs, es necesaria la implementación de medios y recursos especializados para este tema y, entre ello, estandarizar una metodología para la detección de organismos genéticamente modificados sería uno de los procedimientos principales.

1.6 Situación de soya en el Ecuador

La soya (*Glycine max* L) pertenece al grupo de las oleaginosas y tiene un alto valor nutritivo, por lo que tiene varios usos tanto para el consumo humano (carne, leche o harina de soya), como animal (alimentos balanceados). El sector con mayor demanda de este cultivo es el de avicultura ya que la torta de soya constituye cerca del 15-20% de la composición de los alimentos balanceados para aves (“El cultivo de soya”, 2010). En nuestro país el cultivo de esta especie se encuentra distribuido en Guayas, con aproximadamente el 2.6% de la producción, y Los Ríos, con el 97.4% de la producción total (“III Censo Nacional”, 2000). En el año 2008, la producción total de soya a nivel nacional fue de 90,396 toneladas, mientras que en el año 2009, fue de 101,887 toneladas (SIGAGRO, 2010). A pesar de esta cantidad de soya producida en nuestro país, en el 2008 se importó 3,425.99 toneladas de soya de 3 países; para consumo desde Chile (91.21%), para siembra desde Colombia (8.61%) y para siembra y consumo desde Estados Unidos (0.17%). Mientras que en el 2009, se importó 207 toneladas de semilla de soya para siembra de Colombia y 8.01 toneladas de soya en grano para consumo de Estados Unidos (“Consulta de Totales”, 2010). Estos valores son relativamente bajos comparados con las cantidades de pasta de soya importadas, ya que en el 2008, se importó 470,208.48 toneladas de paste de soya, cuyo 94.95% del total corresponde a Argentina y Estados Unidos, mientras que en el 2009, 469788.47 toneladas de pasta de soya fueron importadas, y el 92.64% del total corresponde a los 2 países mencionados. En Estados Unidos el 91% de la soya cultivada es transgénica (“World Statistics”, 2010), y Colombia, a pesar de no

cultivar soya GM, tiene aprobación de importación y uso directo como alimento humano o animal o para procesamiento de este cultivo (SEABA, 2005). Es por esta razón que existe la posibilidad de que soya genéticamente modificada esté ingresando al Ecuador sin una debida autorización, legislación o control.

La soya GM, evento GTS 40-3-2 desarrollado por Monsanto Canadá Inc, se caracteriza por presentar tolerancia al glifosato, ingrediente activo del herbicida *Roundup*, usado para el control de las malezas. Esta línea de soya GM contiene en su genoma una forma modificada del gen que codifica la enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa), extraída de la cepa CP4 de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que permite que este evento sobreviva la aplicación letal de glifosato, ya que el gen introducido codifica una versión bacteriana de la enzima EPSPS tolerante al herbicida, pero que participa adecuadamente en la producción de los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano (Querci y Mazzara, Sesión 7, n.f.; “MON-04032-6 (GTS 40-3-2)”, 2009). La vía metabólica de aminoácidos aromáticos no está presente en mamíferos, aves o formas de vida acuática, por lo que el glifosato no tiene efectos tóxicos en estos organismos (“MON-04032-6 (GTS 40-3-2)”, 2009).

La secuencia codificadora de CP4 EPSPS fue introducida mediante la técnica de transformación denominada biolística en la variedad comercial A5403 de la Compañía Asgrow Seed, esta variedad presenta un potencial de alto rendimiento y, además, resistencia a las razas 3 y 4 del nematodo *Heterodera glycines* que infecta a la soya, así como tolerancia a varias enfermedades de hojas y tallo. La expresión de este gen, introducido en copia única, está regulado por el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), contiene además el CTP4 (chloroplast transit peptide) codificado en *Petunia hybrida* que destina la enzima al cloroplasto, y el elemento transcripcional de

terminación NOS 3' (Nopaline Synthase) de *Agrobacterium tumefaciens* (“MON-Ø4Ø32-6”, 2010; “MON-Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2)”, 2009).

En el Centro para la Evaluación de Riesgo Ambiental del *International Life Sciences Institute* (Estados Unidos), se presenta el análisis de riesgo del evento GTS 40-3-2, que incluye:

- Caracterización molecular y Expresión Génica (sitios de inserción, estabilidad genética de la secuencia introducida, expresión del gen CP4 EPSPS, Evaluación del segmento de 250pb de CP4 EPSPS próximo al terminador NOS, evaluación del segmento de 72pb de CP4 EPSPS)
- Consideraciones de seguridad ambiental (morfología, rendimiento, características de germinación, susceptibilidad a enfermedades e insectos, cruzamiento, potencialidad de convertirse en maleza, tiempo de floración, efectos adversos a organismos no blancos y el impacto en biodiversidad)
- Consideraciones de seguridad como alimento (información nutricional, exposición dietética, potencialidad de efectos pleiotrópicos, toxicidad, alergenicidad) (Monsanto, 2000).

Estos análisis de riesgo se han realizado en todos los países donde el evento GTS 40-3-2 ha sido aprobado (Anexo 2).

1.7 Métodos de detección

Los organismos genéticamente modificados pueden ser identificados detectando el gen insertado, el mRNA transcrito, la proteína codificada, el metabolito o el fenotipo del evento. A pesar de que en la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas de análisis de OGMs, como espectrometría de masa, cromatografía, chips de ADN, entre otros; aquellas basadas en la amplificación del material genético insertado mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ha sido el método generalmente aceptado para

propósitos regulatorios (Lübeck, n.f.). La PCR es una técnica molecular que permite la amplificación de un segmento específico de ADN presente en baja concentración en una mezcla con otras secuencias de ADN. La amplificación es posible gracias a dos pequeñas secuencias o primers que se hibridan con su secuencia complementaria en las hebras de ADN del gen de interés. La ADN polimerasa es la enzima encargada de la amplificación exponencial de la secuencia diana, multiplicando varias veces la concentración de la secuencia situada entre el par de primers (Querci, n.f.).

Es posible diferenciar tres etapas en el proceso de detección. *La detección en sí*, o detección cualitativa, cuyo fin es establecer la presencia o ausencia de ADN o proteínas asociadas a eventos GM conocidos. *La identificación*, cuyo objetivo es determinar específicamente el o los eventos presentes para así permitir clasificar los aprobados. Y *la cuantificación*, cuyo propósito es establecer el contenido porcentual de OGM en una muestra dada para determinar si los umbrales de contenido transgénico son cumplidos (Lübeck, n.f.). Estos umbrales difieren mucho de una región a otra. En Japón, por ejemplo, un alimento debe ser etiquetado solo si el porcentaje de OGM sobrepasa el 5%, mientras que en la Unión Europea, el umbral es de 0.9% de OGM (Buh *et al*, 2010).

Las pruebas de identificación de transgénicos son importantes para cumplir varios objetivos:

- Determinar el origen del evento GM con el objetivo de establecer reclamos de propiedad intelectual.
- Rastrear la localización y además garantizar el límite de zonas donde haya habido una liberación accidental de un OGM.
- Confirmar la declaración de un OGM durante su movimiento transfronterizo.

- Atender los requerimientos de contenido máximo de ciertos países que poseen pautas de etiquetado. En la Unión Europea, por ejemplo, el etiquetado es obligatorio en casos donde más del 0.9% de los ingredientes analizados son transgénicos (Elenis *et al*, 2008).

El método de cribado, elaborado por Pietsch *et al* en 1997 (Lipp *et al*, 1999), se basa en la detección de elementos comunes en varios cultivos GM, como el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (conocido como CaMV por sus siglas en inglés) y el terminador NOS del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. La utilización de estos primers permiten la detección de material vegetal transgénico en la mayoría de organismos genéticamente modificados aprobados en el mercado mundial (Tozzini *et al*, 2000; Querci y Mazzara, Sesión 8, n.f.).

1.8 PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real o PCR Cuantitativa es una técnica molecular centrada no solo en la amplificación y detección sino también en la cuantificación del producto amplificado. En la PCR en tiempo real la especificidad es uno de los factores más significativos, y ésta depende del tipo de sustancias utilizadas para generar la fluorescencia, depende de si se usa sondas marcadas con agentes fluorescentes (sondas TaqMan, sondas FRET, balizas moleculares, *Scorpions* y sondas TaqMan Minor Groove Binder) o si solo se usa agentes fluorescentes o colorantes de intercalación (bromuro de etidio, SYBR Green I) (Weighardt, n.f.).

Los métodos de detección validados por la Unión Europea son principalmente cuantitativos, específicos para cada evento, mediante PCR en tiempo real con la tecnología TaqMan utilizando una gran variedad de primers específicos para la amplificación de ADN presente en los OGMs (“Status of Dossiers”, 2010) y sondas marcadas con agentes fluorescentes reporteras específicas también para cada evento. La tecnología se basa en la

excitación de los colorantes fluorescentes presentes en las sondas TaqMan. La detección del producto amplificado es cuantificado ya que el agente reportero emite fluorescencia solo cuando el agente “quencher” es eliminado del fragmento durante el ciclo de extensión en la PCR (“TaqMan Principles”, n.f.), de esa manera, la cuantificación se realiza después de cada ciclo. Ventajosamente, existe otro método de detección más económico basado en la presencia de un agente intercalante llamado Sybr Green I que se une a todo ADN de doble cadena (Barbau-Piednoir et al, 2009) en el surco menor de la hélice (Weighardt, n.f.) pero que no es tan específico pues se intercala a cualquier ADN, sin importar si es el ADN diana.

1.8.1.1 PCR en tiempo real mediante SYBR Green

La reacción de la PCR se lleva a cabo en presencia del colorante SYBR Green que fluoresce cuando se intercala en la hélice del ADN. Se une solamente a ADN de doble cadena. El SYBR Green es un compuesto muy estable ya que solo el 6% de su actividad se pierde después de 30 ciclos. La fluorescencia se incrementa con la cantidad del producto de PCR y es por esta razón que el equipo fue diseñado para realizar la cuantificación cuando cada ciclo se completa (Roche, 2008).

Una de las principales limitaciones de un sistema de detección basado en el SYBR Green I es la carencia de especificidad al momento de monitorear el producto amplificado, por lo que el instrumento cuantifica todas las moléculas de ADN de doble cadena presentes en la reacción, tanto productos de PCR específicos como no específicos, y los dímeros de primers. Para solucionar este problema se desarrolló el análisis de curva de disociación. La temperatura de disociación, o T_m (Temperatura de *melting*), del producto de PCR se define como la temperatura en la que el 50% de las hélices se disocian (Barbau-Piednoir *et al*, 2009). Debido a que el ADN se funde en un rango de temperatura, en lugar de a una

temperatura específica, la T_m permite distinguir entre amplificación específica y no específica y así cuantificar los componentes que tienen la misma temperatura de disociación (Weighardt. n.f.; Buh *et al*, 2010).

1.8.1.2 Ct y Material de Referencia Certificado

El ciclo en el que la fluorescencia excede un umbral de detección, el C_t (por sus siglas en inglés *Cycle Threshold*), se correlaciona con la cantidad de producto amplificado (Barbau-Piednoir *et al*, 2009). El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. En general para que sea válida esta técnica se requiere realizar con las mismas condiciones y en paralelo una curva patrón o estándar con concentraciones conocidas del producto a amplificar para conocer la cantidad total de ADN diana presente en las muestras a analizar. Se compara entonces los C_t de las muestras estándares con los C_t de las muestras analizadas (Buh *et al*, 2010).

Los materiales de referencia certificados son elementos con propiedades estables y uniformes autenticadas por una institución reconocida especializada, que contienen una concentración determinada del ADN diana, en este caso un porcentaje de OGM establecido. La institución, después de varios análisis asegura que la concentración en cada muestra estándar o de referencia es la correcta para ser utilizada en la calibración de métodos de análisis (Departamento Agricultura FAO, 1996). Varios autores han comprobado que la concentración de ADN diana amplificado en reacciones de PCR en tiempo real es proporcional al número de ciclos de la PCR durante la fase exponencial. Por lo que, si se puede determinar el número de ciclos que le toma a una muestra alcanzar un punto determinado en su curva exponencial (mediante el valor de su C_t), es posible calcular el contenido exacto de ADN genéticamente modificado al comparar con los resultados obtenidos por las muestras de la curva estándar (Lübeck, n.f.).

1.8.1.3 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Existen dos parámetros que son importantes en un laboratorio de detección y cuantificación de OGMs y en un método de detección. El primero es el Límite de Detección que, según el Compendio de Métodos de Referencia para Análisis de OGMs, es la cantidad o concentración más baja en una muestra que puede ser confiablemente detectada con un nivel aceptable de precisión y exactitud. El segundo es el Límite de Cuantificación que es la cantidad o concentración más baja en una muestra que puede ser confiablemente cuantificada con un nivel aceptable de precisión y exactitud (Joint Research Centre, 2010). El límite de detección en la mayoría de métodos validados en Europa es 0.01%. Este valor ha sido calculado por la cantidad de ADN que se coloca en la reacción. Al especular que en una reacción, pueden estar presentes 10000 genomas de una especie y si esa muestra tiene 0.01% de OGM, el número de genomas GM será aproximadamente 1. A pesar de que puede variar dependiendo del tamaño del genoma y la concentración de ADN, este valor siempre será detectable pero muy bajo para ser cuantificado. La amplificación de muestras como estas resultará en grandes diferencias en la intensidad de la señal por lo que el límite de cuantificación establecido en varios laboratorios llega a ser 0.1% (10 veces el límite de detección) (Lübeck, n.f.). En Argentina, por otro lado, el límite de detección es 0.05% y el límite de cuantificación es de 0.1% (“Análisis de Detección”, 2002).

En la presente investigación se realizó la estandarización de un método de detección y cuantificación de soya transgénica mediante PCR en tiempo real con tecnología SYBR Green. Veinte y cuatro muestras de soya en grano y 1 muestra de pasta de soya fueron analizadas para verificar la presencia o ausencia de OGMs. Este análisis se llevó a cabo mediante la amplificación de dos pares de primers específicos para el promotor 35S y el terminador NOS como elementos presentes únicamente en eventos

transgénicos y ausentes en organismos convencionales (Barbau-Piednoir et al, 2009). Los resultados positivos de la amplificación de las muestras analizadas fueron comparados con los resultados de la amplificación del material de referencia certificado para obtener el porcentaje de transgénico presente en las muestras positivas.

2. Justificación

Como se mencionó anteriormente, la estandarización de un protocolo para la detección de OGMs representa uno de los principales procesos para verificar el cumplimiento de las regulaciones existentes en el Ecuador. Este estudio pretende establecer la presencia o ausencia de soya transgénica en muestras de soya en grano colectadas en distintos lugares del Ecuador y, verificar así, si la declaración de país libre de semillas y cultivos transgénicos es cumplida a pesar de ser un país importador de semillas de países productores de cultivos GM.

La carencia de personal capacitado e instituciones especializadas en este tema refleja la importancia de la estandarización de un protocolo para la evaluación de organismos genéticamente modificados y así contribuir con una metodología de laboratorio precisa y confiable para la detección de OGMs en el país, cuyos resultados servirán de apoyo para el cumplimiento de las regulaciones vigentes en la actualidad.

3. Objetivo General

El objetivo principal de esta investigación radica en la estandarización de una metodología para la detección y cuantificación de soya transgénica mediante PCR en tiempo real.

4. Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de soya transgénica mediante la amplificación de secuencias específicas del promotor 35S y del terminador NOS en 26 muestras de granos de soya colectados en 4 provincias del Ecuador.
- Cuantificar la cantidad de soya GM presente en las muestras positivas para la presencia del promotor 35S y terminador NOS.
- Determinar el protocolo estandarizado para la extracción de ADN mediante *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, USA)

5. Área de Trabajo

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y el Laboratorio de Biología Molecular del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito en el campus de Cumbayá.

Las muestras de semillas de soya fueron colectadas en la provincia de Los Ríos y Guayas, mientras que las muestras de soya en grano fueron colectadas de las provincias de Azuay, Guayas y Cotopaxi. Una muestra de paste de soya importada desde Argentina fue colectada en Pichincha y una muestra de soya en grano importada de Perú fue colectada en Guayaquil.

6. Materiales

6.1 Procesamiento y molienda de muestras

- 24 muestras de 1Kg de soya en grano de Los Ríos, Guayas, Azuay y Cotopaxi
- 1 muestra de 1Kg de pasta de soya importada de Argentina
- 1 muestra de 1Kg de soya en grano importada de Perú

- 1 muestra de soya transgénica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina
- Material de Referencia Certificada (evento GTS 40-3-2, línea AG5602 RR) del Instituto de Medidas y Materiales de Referencia (IRMM) de Bélgica
- Molino metálico manual Victoria
- Triturador eléctrico Sunbeam

6.2 Extracción, cuantificación y dilución de ADN

- Balanza analítica *LA230S* Sartorius
- 300mg de polvo fino de 26 muestras de soya
- *DNeasy Plant Mini Kit*. Qiagen
- Cámara de arena *Multi-Blok*. Thermo Scientific
- Espectrofotómetro *NanoDrop 1000*. Thermo Scientific
- Agua libre de ARNasas y ADNasas.

6.3 Amplificación mediante PCR en punto final

- Cámara de flujo laminar *Horizontal Clean Bench* Labconco
- Agua libre de ARNasas y ADNasas
- ADN de soya transgénica
- ADN de plásmido pBI121 como control positivo
- ADN de naranjilla como control negativo
- ADN de soya de las 26 muestras analizadas
- Buffer de reacción de PCR 10X Invitrogen
- dNTPs Invitrogen
- Primers Forward y Reverse para amplificación de P35S y TNOS Invitrogen.

P35S Forward

GAAGGTGGCTCCTACAAATGC

P35S Reverse TAGTGGGATTGTGCGTCATCC
TNOS Forward GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA
TNOS Reverse TTATCCTAGGTTGCGCGCTATATTT

- MgCl₂ Invitrogen
- ADN polimerasa Invitrogen
- Termociclador *T Personal* Biometra
- Cámara de electroforesis *MGU-502T* C.B.S. Scientific Co.
- Fuente de poder *EPS-300 II* C.B.S. Scientific Company
- Agarosa SeaKem
- TBE 10X
- Colorante *SYBR Safe* Invitrogen
- Buffer de carga *BlueJuice* Invitrogen
- Marcador de peso molecular 100bp *TrackIt* Invitrogen
- Fotodocumentador *Gel Doc XR* BIO-RAD

6.4 Detección y Cuantificación mediante PCR en tiempo real

- Cámara de flujo laminar
- *QuantiTect SYBR Green PCR* Qiagen
- Primers Forward y Reverse para amplificación de P35S y TNOS Invitrogen

P35S Forward GAAGGTGGCTCCTACAAATGC
P35S Reverse TAGTGGGATTGTGCGTCATCC
TNOS Forward GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA
TNOS Reverse TTATCCTAGGTTGCGCGCTATATTT

- ADN de material de referencia certificado IRMM
- ADN de plásmido pBI121 como control positivo

- ADN de naranjilla como control negativo
- ADN de soya de las 26 muestras analizadas
- Agua libre de ARNasas y ADNasas
- Termociclador *CFX96* BIO-RAD

7. Metodología

7.1 Obtención de muestras.

La evaluación se realizó en un total de 26 muestras de granos de soya obtenidos de varias fuentes (Tabla 1). Las muestras de los centros de acopio fueron obtenidas mediante el contacto del Ing. Julio Valenzuela de PRONACA, quien las tomó y etiquetó para ser enviadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal para su análisis. Las demás muestras fueron obtenidas mediante la compra directa del material en distintas ciudades del país, tanto en mercados como en supermercados. Vale la pena precisar que una muestra fue pasta de soya importada de Argentina proporcionada por PRONACA.

La muestra de soya transgénica usada como control positivo fue enviada desde Buenos Aires, Argentina por la Dra. Dalia Lewi, directora del área de Transformación Genética para el Mejoramiento Vegetal del Instituto de Genética del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).

Para el desarrollo y validación del método de PCR cuantitativo, además de las muestras a analizar, se adquirió Material de Referencia Certificado molido con diferentes fracciones (0.01%, 0.1%, 1% y 10%) de masa de soya *Roundup Ready*TM (evento GTS 40-3-2, línea AG5602 RR) mezclado con polvo fino de soya no GM, el mismo que fue importado directamente del IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) de la Comisión Europea de la JRC (*Joint Research Centre*).

7.2 Preparación de muestras.

7.2.1 Limpieza

Una vez recibidas, las muestras de soya en grano fueron lavadas con agua corriente con el objetivo de eliminar impurezas o suciedad externa, luego fueron colocadas sobre papel toalla por un lapso de 24 a 48 horas para que se sequen por completo, tiempo en el que se eliminó cualquier material que no correspondiera a granos de soya. La pasta de soya no requirió preparación ya que es un alimento procesado (soya cocida molida).

7.2.2 Molienda.

Las muestras adquiridas en el 2008 fueron molidas tres veces mediante un molino metálico manual ya que después de la tercera molienda el resultado era un polvo suficientemente manejable para el proceso de extracción de ADN. Las muestras obtenidas en el 2009 y 2010 fueron molidas usando un triturador eléctrico, a manera de una licuadora cerrada. Debido al resultado de la molienda obtenido por el molino metálico, se decidió moler nuevamente las muestras adquiridas en el 2008 usando el triturador eléctrico. Los residuos de harina de soya que quedaban en la pared del molino o del asistente fueron recogidos con una cucharita estéril y colocados en un tubo eppendorf estéril para la posterior extracción de ADN.

7.3 Procesamiento de ADN

7.3.1 Extracción de ADN.

Se tomó 3 submuestras de cada kilo de harina de soya con el objetivo de hacer la extracción por triplicado en caso de obtener insuficiente cantidad de ADN en alguna muestra. La extracción de ADN se realizó a partir de aproximadamente 100mg de polvo fino de granos de soya, mediante la utilización del *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, USA) siguiendo el protocolo *Purification of total DNA from Plant Tissue (Mini protocol)*

indicados en el manual *DNeasy Plant Handbook* de Julio 2006. Se realizaron algunas modificaciones en el procedimiento, las mismas que se mencionan a continuación.

La extracción de ADN se inicia al agregar 4 μ l de solución stock de ARNasa (100mg/ml) y 400 μ l de Buffer AP1 que, a diferencia a lo que el manual establece, fue precalentado a 65°C en el tubo eppendorf con 100mg de polvo fino de soya molida. El tiempo de incubación de las muestras a 65°C fue extendido de 10 a 15 minutos para tener mayor tiempo de lisado de las células vegetales. El tiempo de incubación de las muestras en hielo se aumentó de 5 a 8 minutos, para que exista mayor tiempo de precipitación de detergentes, proteínas y polisacáridos, y el tiempo de centrifugación del lisado a 20000 x g se aumentó de 5 a 7 minutos para poder observar una diferencia notoria entre el sobrenadante y el precipitado.

7.3.2 Cuantificación de ADN

El ADN obtenido fue resuspendido en el buffer de elución proporcionado en el kit. El material genético fue guardado a -20°C en un congelador y días posteriores fue cuantificado mediante el uso del Espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific, USA).

7.3.3 Dilución de ADN

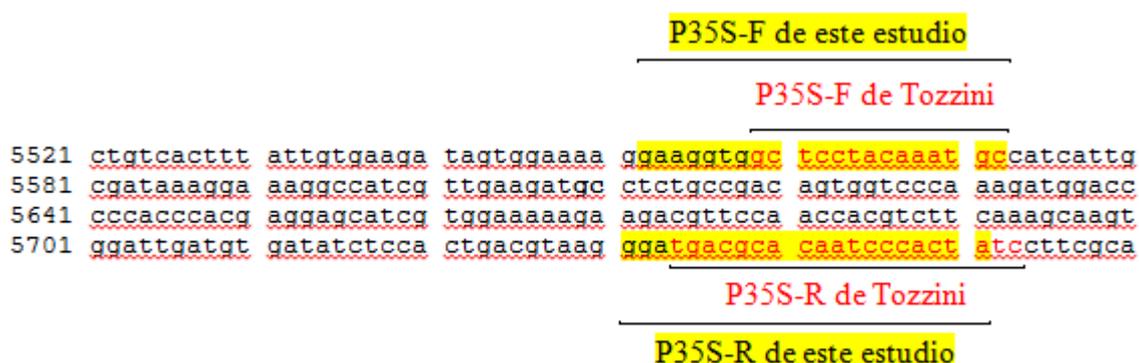
Para posteriores análisis, las muestras fueron diluidas en agua libre de ARNasas y ADNasas hasta obtener una concentración de aproximadamente 50ng/ μ l para PCR convencional y de 25ng/ μ l para PCR en tiempo real.

7.4 Amplificación mediante PCR en punto final

El protocolo de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) fue desarrollado para la detección del promotor 35S del virus del mosaico de coliflor y del terminador NOS del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* que son elementos frecuentemente usados en el desarrollo de OGMs. Los primers utilizados (Tabla 2) fueron sintetizados por

Invitrogen y fueron tomados de dos investigaciones publicadas. Los primers para la amplificación del terminador NOS fueron tomados de un estudio realizado en Bruselas, Bélgica (Barbau-Piednoir et al, 2009), cuyo amplicón tiene un tamaño de 69pb (Tabla 2).

Para la amplificación del promotor 35S, se tomó en cuenta el estudio realizado por Tozzini *et al* (2000). A continuación se presenta un segmento del gen del promotor 35S del plásmido pBI121, donde se observa resaltado en amarillo los sitios de hibridación de los primers usados en este estudio y en letras de color rojo los sitios de hibridación de los primers usados en la publicación de Tozzini *et al* (2000).



Los primers fueron modificados de manera que el primer *forward* incluyera 7 nucleótidos corriente arriba y el primer reverse se movilizara dos nucleótidos corriente arriba e incluyera una base más en la misma dirección, dando como resultado un amplicón de 200pb.

La mezcla de las reacciones de amplificación fue preparada dentro de una cámara de flujo laminar *Purifier Clean Bench* (Labconco, USA). En un volumen final de 10ul de mezcla de reacción, se agregó buffer de PCR a una concentración final de 1X, 1.5U de enzima Taq Polimerasa, 2mM de MgCl₂, 0.5mM de dNTPs, 0.5μM de cada primer (*Invitrogen Corporation*, California, USA) y 200ng de ADN (Tablas 3 y 4). El termociclador *T-Personal Combi* (Biometra, Alemania) fue programado para la amplificación del promotor 35S con un paso de desnaturalización inicial de 4 minutos a

94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, anclaje de primers a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, terminando con un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Por otro lado, el programa de amplificación del terminador NOS se inició con desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, anclaje de primers a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto y terminando con una extensión final a 72°C por 10 minutos. A más de las muestras analizadas, se usó ADN de naranjilla con la misma concentración como control negativo ya que en su genoma no existen las secuencias complementarias a los primers usados en ese estudio, y una dilución del plásmido pBI121, el mismo que contiene el p35S y el tNOS, como control positivo.

A los productos de la PCR se agregó 2µl de Buffer de Carga *BlueJuice* (Invitrogen, USA) y fueron analizados mediante la técnica de resolución electroforética en geles de agarosa. Durante esta investigación, los geles generados se prepararon al 2% de agarosa con buffer TBE 1X, teñido con *Sybr Safe ADN gel stain* (Invitrogen, USA), y se usó el marcador de peso molecular *TrackIt 100bp* (Invitrogen, USA). Los resultados fueron evaluados por exposición directa a luz UV mediante el fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio-Rad, Canadá), donde se pudo observar la presencia o ausencia de las bandas correspondientes a los amplicones analizados.

7.5 Detección y Cuantificación mediante la amplificación por PCR en Tiempo Real

Para la amplificación de las dos secuencias de interés (P35S y TNOS) mediante PCR en tiempo real se usó el kit *QuantiTect SYBR Green PCR* (Qiagen, USA). La mezcla de las reacciones de amplificación fue preparada en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada con luz UV. En un volumen final de 20µl de mezcla de reacción se agregó 1X de Buffer *QuantiTect SYBR Green*, que contiene las concentraciones

adecuadas de MgCl₂, dNTPs, Taq polimerasa y SYBR Green, se agregó además 0.5 μM de cada primer y 100ng de ADN de soya. Para la amplificación del promotor 35S, el termociclador CFX96 (Bio-Rad, Canadá) fue programado con un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 43 ciclos de amplificación, con una desnaturalización a 95°C por 10 segundos, anclaje de primers a 58°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 12 segundos; y para terminar se realizó un análisis de curva de disociación en un rango de temperatura desde 70°C a 95°C con un incremento de 0.5°C cada 15 segundos. Para la amplificación del terminador NOS, se usó el mismo programa que para la detección del P35S, con la única variación en la temperatura de anclaje de los primers de TNOS que fue de 55°C y en el análisis de curva de disociación en la que la temperatura varió desde 60°C a 85°C con un incremento de 0.5°C cada 15 segundos.

Para la amplificación del promotor 35S y del terminador NOS, a más de las muestras analizadas por duplicado, se incluyó ADN de naranjilla como control negativo ya que su genoma carece de las secuencias diana de amplificación, 4 muestras por duplicado del material de referencia certificado para la generación del curva estándar, dilución del plásmido pBI121 como control positivo y una reacción sin ADN como control de contaminación. Los análisis incluidos en cada corrida tanto para la amplificación del promotor 35S como del terminador NOS fueron la curva de amplificación, curva estándar, y picos de disociación.

8. Resultados

8.1 Obtención, preparación y molienda de muestras.

Se obtuvo un total de 26 muestras de soya en grano para el análisis de detección de soya transgénica mediante la amplificación de secuencias específicas del promotor 35S y del terminador NOS: 16 muestras de semillas de soya de centros de acopio de Los Ríos en

los años 2008, 2009 y 2010 y 10 muestras de soya comercializada que fueron adquiridas en el año 2009. A más de las muestras a analizar, se obtuvo una muestra de soya transgénica molida importada del INTA de Argentina como control positivo y 4 muestras de material de referencia certificado importado del IRMM para la obtención de la curva estándar en el análisis de la PCR en tiempo real. ADN de naranjilla proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ fue usado como control negativo y ADN de plásmido pBI121 proporcionado por el mismo Laboratorio como control positivo.

La molienda de las muestras de soya en grano mediante el triturador eléctrico resultó en un polvo de soya molida mucho más fino que el obtenido mediante el molino manual, lo que permitió una mayor cantidad y mejor calidad de ADN.

8.2 Extracción y Cuantificación de ADN.

El proceso de extracción resultó exitoso. Las modificaciones realizadas al protocolo de extracción *Purification of total DNA from Plant Tissue (Mini protocol)* del *DNeasy Plant Handbook* citadas en la sección 7.3.1 dieron los mejores resultados no solo en cantidad de ADN sino también en calidad y pureza. Los valores de las cuantificaciones del ADN obtenido tras la extracción de las 26 muestras variaron desde 20.2ng/μl hasta 1920.2ng/μl. Los resultados de cuantificación de ADN para las 26 muestras extraídas se presentan en la Tabla 5.

8.3 Detección mediante PCR en punto final

Se estandarizó el programa de amplificación del promotor 35S y del terminador NOS, para lo cual fue necesaria la variación de concentración inicial de ADN desde 40ng por reacción hasta obtener los mejores resultados con 200ng de ADN por reacción de amplificación. Se realizaron amplificaciones cuya temperatura de anclaje del par de primers P35S varió desde 57°C hasta 58°C y del par de primers TNOS desde 53°C hasta 60°C.

Como resultado de la PCR en punto final y la separación en gel de agarosa de los productos de amplificación del promotor 35S y del terminador NOS, se logró observar bandas del tamaño esperado de los amplicones correspondientes al promotor 35S (200pb) y al terminador NOS (69pb) en el control positivo y en 2 muestras de las 26 analizadas. La primera muestra positiva era de soya en grano de Latacunga de la empresa Cereales la Pradera comprada en un supermercado en Quito (muestra 22) y la segunda de pasta de soya importada de Argentina (muestra 23) (Figura 1 y 2).

8.4 Detección y Cuantificación mediante PCR en Tiempo Real

Se estandarizó un protocolo de detección de OGMs para granos de soya mediante PCR en tiempo real utilizando las temperaturas establecidas en la amplificación mediante PCR en punto final. La concentración inicial de ADN en la reacción de PCR en tiempo real varió desde 40ng por reacción hasta obtener la amplificación con mejores resultados con 100ng de ADN por reacción.

Los resultados obtenidos en la amplificación por PCR en tiempo real del promotor 35S y del terminador NOS en las 26 muestras coincidieron con los resultados obtenidos en la amplificación por PCR en tiempo final.

En la Figura 3 se aprecian las curvas de amplificación del promotor 35S de todas las muestras y sus valores Ct respectivos. Mientras menor es el valor de Ct , mayor es la concentración de ADN diana. Se puede observar que el control positivo es la primera muestra que amplifica, su Ct es 8.94 lo que indica su alta concentración de ADN diana. La muestra 23 tiene un Ct cerca de 21 y las muestras del material de referencia certificada de 10%, 1% y 0.1% de soya GM son las muestras con menor valor en el Ct (desde 23.5 hasta 29) después de las ya mencionadas, seguidas de la muestra 22 con un Ct cerca de 30. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la amplificación por PCR en punto final, ya que tanto la muestra 22 como la muestra 23 tiene suficiente ADN amplificado para ser

detectado por la técnica de resolución electroforética en geles de agarosa. Es posible apreciar, además, que las muestras restantes tienen amplificación pero en un ciclo demasiado tardío lo que demuestra presencia adventicia de semillas GM, que puede ser definida como “la presencia no intencional, en un lote o envase, de bajos niveles de semillas que no sean de la variedad o híbrido que está siendo comercializado” (Teichert y André, 2009).

En la Figura 4 se presentan las curvas de amplificación del terminador NOS junto a los *Ct* correspondientes de cada muestra. Es posible observar que el control positivo tiene un *Ct* cerca de 10, la muestra 23 un *Ct* cerca de 26, las muestras del material de referencia certificada con contenido de 10%, 1% y 0.1% tienen *Ct* desde 29 a 35 y la muestra 22 tiene un valor de 36 en su *Ct*. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos en la amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real.

En la Figura 5 y en la Figura 6, se presenta la curva estándar de la amplificación del promotor 35S y del terminador NOS respectivamente. Se aprecia que la mayoría de muestras se encuentran en la curva en niveles menores a 0.1% de soya GM e incluso algunas se encuentran muy por debajo de la muestra que contiene 0.01% de OGM, mientras que la muestra 22 se encuentra hacia la derecha de la muestra estándar que contiene 0.1% y la muestra 23 contiene mayor cantidad de producto amplificado que la muestra estándar con 10% de soya GM.

La curva estándar generada en la amplificación del promotor 35S demuestra una eficiencia del 87.6% y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.943 (Figura 5), mientras que para la curva estándar de la amplificación del terminador NOS indica una eficiencia de 76.8% y un R^2 de 0.981 (Figura 6).

En la amplificación del promotor 35S, la temperatura de disociación fue de 81°C y en la amplificación del terminador NOS, la *T_m* fue de 71.5°C, esta diferencia es notoria

debido a la diferencia entre el tamaño del amplicón del promotor (200pb) y el tamaño del amplicón del terminador (69pb) (Figura 7 para amplificación del promotor 35S y Figura 8 para la amplificación del terminador NOS).

9. Discusión

9.1 Obtención, preparación y molienda de muestras.

Vale recalcar que PRONACA facilitó la obtención de las muestras de soya en grano colectadas en los centros de distribución de la provincia de los Ríos, cuya producción de soya es fundamental para suplir el mayor porcentaje de demanda de este cultivo en el país. Estas muestras son las más importantes ya que son muestras de soya cultivadas en el territorio ecuatoriano, a diferencia de las otras muestras que son consumidas pero no necesariamente sembradas. Esta diferencia es importante ya que el país fue declarado libre de semillas y cultivos transgénicos y no de productos que contienen material genéticamente modificado.

En el Manual de procedimientos de laboratorio para detección de OGMs, formulado por el Instituto de Investigaciones Alexander Van Humboldt de Colombia, se aclara que el muestreo y la preparación de las muestras son pasos muy importantes en el proceso de análisis de transgénicos y que es crucial que la muestra sea suficientemente representativa del lote que se quiere analizar (Álvarez, Castellanos y Maldonado, 2007). En este estudio, las muestras fueron proporcionadas por el Ing. Valenzuela, contacto de PRONACA, por lo que el procedimiento de muestreo no forma parte de la metodología de este estudio y no se podría asegurar la manera en que fueron colectadas. Por otro lado, las muestras compradas en distintos mercados y supermercados de Ecuador, al venir previamente empacadas, no es posible certificar que las muestras sean representativas del lote al que pertenecían.

En esta investigación se decidió seguir la metodología propuesta en el Laboratorio de Detección de OGMs del Instituto de Biotecnología de Buenos Aires, el mismo que especifica que la cantidad mínima necesaria para el análisis de evaluación de presencia de OGMs es de 3000 granos ya que tal cantidad asegura los límites de detección y de cuantificación (“Análisis de Detección”, 2002). En este estudio se procesó muestras de 1Kg de semilla de soya o soya en grano que equivale a aproximadamente a 4500 granos.

Con respecto a la preparación de las muestras, fue indispensable el lavado con agua corriente y la selección del material ya que muchas contenían granos de maíz y arroz, tierra, pedazos de ramas, entre otras cosas, lo que habría dificultado el procesamiento de las muestras al extraer ADN no únicamente de soya (bacterias y hongos en la tierra, maíz y arroz) y por presencia de nucleasas en la tierra.

Los resultados obtenidos a partir de la molienda con el triturador eléctrico fueron significativamente mejores al comparar con el material molido obtenido después de la molienda con el manual metálico manual.

9.2 Extracción y Cuantificación de ADN.

Debido a que la extracción de ADN representa la primera etapa de la mayoría de análisis moleculares, el método de extracción es uno de los factores más importantes (Kodama *et al*, n.f.; Tengal *et al*, 2001; Cankar *et al*, 2006). Por esta razón, al elegir el método para esta investigación se tomó en cuenta publicaciones previas y los resultados más convenientes para lograr el objetivo planteado. La extracción de ADN mediante el *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, USA) permitió obtener ácido nucleico de buena calidad y sin la presencia de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa con el objeto de evitar los falsos negativos. Este kit de extracción es el predilecto en varias investigaciones de detección y análisis de OGMs (Tengal *et al*, 2001; Uri *et al*, 2007; Karudapuram y Batey, n.f.). Corbisier *et al* (2005), concluyen en su estudio que el nivel de fragmentación

de ADN depende exclusivamente del método de extracción. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el método de extracción fue el adecuado.

La extracción de ADN a partir de pasta de soya resultó ser la más difícil ya que, al ser un alimento procesado, la cantidad de ADN es menor y el nivel de degradación es mayor (Tengel *et al*, 2001). Fue necesario realizar tres intentos de extracción de ADN con pequeñas variaciones en el protocolo como en el tiempo de incubación en buffer AP1 a 65°C de 15 a 17 minutos para tener un mayor tiempo de lisado de las células y el tiempo de centrifugación final de 7 a 9 minutos para obtener una diferencia notoria entre el sobrenadante y el precipitado de la muestra de pasta de soya.

Se demostró que la molienda con el asistente de cocina dio los mejores resultados al momento de extracción ya que la cantidad de ADN obtenido a partir del polvo fino fue mayor al compararlo con la extracción de ADN de las muestras molidas con el molino metálico manual, por lo que se decidió repetir la molienda de las muestras cuyos residuos no eran polvo fino y posteriormente realizar nuevas extracciones.

9.3 Detección de soya genéticamente modificada mediante PCR

Dentro del proceso de estandarización del protocolo de detección de soya transgénica mediante PCR, existieron diversos inconvenientes que ocasionaron la toma de distintas decisiones a lo largo de la investigación. Las amplificaciones se iniciaron con dos pares de primers distintos a los mencionados anteriormente. Los primers usados en un principio correspondían a investigaciones sobre detección de OGMs pero después de una serie de pruebas de PCR en punto final, los resultados obtenidos no fueron los esperados, por lo que se decidió cambiar de pares de primers, cuyos resultados fueron presentados en la sección Resultados. Se llegó a la conclusión de que los primers fueron mal sintetizados ya que después de varias amplificaciones con variaciones en temperatura de anclaje de primers, concentración de $MgCl_2$ y concentración de ADN no se pudo obtener producto

amplificado ni siquiera en el control positivo. Las condiciones de amplificación con los primers especificados en la Tabla 2 fueron estandarizadas de una manera más sencilla, ya que únicamente se probó variaciones en la temperatura de anclaje de primers y la concentración inicial de ADN. Al inicio del proyecto en el año 2009, se logró amplificación de las muestras positivas en reacciones con 40ng de ADN, pero al final del proyecto, cuando ya las condiciones fueron completamente estandarizadas, no se logró resultados satisfactorios con tal cantidad de ADN, por lo que se decidió realizar pruebas de amplificación variando la concentración hasta obtener resultados óptimos con 200ng de ADN para la PCR en punto final y 100ng de ADN para la PCR en tiempo real.

Debido a que es importante comprobar mediante controles positivos la eficiencia y calidad de la extracción y amplificación de ADN, se usó una dilución del plásmido pBI121 como referencia de la presencia del amplicón tanto del promotor 35S como del terminador NOS. Ya que puede darse contaminación durante el proceso de aislamiento del ADN y preparación de la reacción de PCR, se usó ADN de naranjilla como referencia de ausencia de la secuencia diana de amplificación. Ambos resultados fueron los esperados ya que no se observó contaminación del control negativo en ninguna corrida y la presencia de una única banda del tamaño esperado para el promotor y una única banda también del tamaño esperado para el terminador en el control positivo demostró la eficiencia de la reacción de PCR en punto final.

La razón por la que se realizó una evaluación preliminar mediante PCR en punto final fue porque es la técnica más simple también validada para la detección de organismos genéticamente modificados. Varios estudios de análisis de OGMs se han estandarizado en PCR en punto final (Tozzini, *et al*, 2000; Tengal *et al*, 2001; “The Polymerase Chain”, n.f.; “Análisis de Detección”, 2002). Porque la eficiencia de la PCR en punto final varía de una reacción a otra e incluso en ciclos sucesivos de una misma reacción, provocando que la

amplificación se de en manera no exponencial y a una velocidad de reacción no conocida (Weighardt, n.f.; Lübeck, n.f.), esta PCR carece de información cuantitativa exacta, por lo que esta investigación se centra principalmente en el desarrollo de un método de detección mediante PCR en tiempo real.

A pesar de que esta investigación se centra únicamente en análisis de granos de soya, se decidió incluir la muestra de pasta de soya por ser importada de Argentina. En ese país, en el 2009 la producción biotecnológica de soya representó el 98.9% de la producción nacional (“World Statistics”, 2010), por lo que la probabilidad de que la pasta de soya sea transgénica era muy alta. Los resultados de este estudio confirman esa probabilidad, ya que se demostró que la pasta de soya contenía en su ADN las secuencias del promotor 35S y del terminador NOS. La pasta de soya al ser alimento procesado ya no se considera ni semilla ni cultivo, por lo que este resultado no representa un conflicto con el artículo 401 de la Constitución del Ecuador ya que únicamente se especifica que el país es libre de semillas y cultivos transgénicos. Sin embargo, al tener resultados positivos en la pasta de soya se demuestra que la Ley de Defensa del Consumidor y la Ley Orgánica de Salud no son cumplidas ya que mencionan que los productos derivados de alimentos genéticamente modificados deben ser etiquetados.

Con respecto al método de detección mediante PCR en tiempo real, es importante mencionar que se estandarizó un protocolo para la detección y cuantificación de soya genéticamente modificada, cuyas condiciones fueron especificadas en la sección 7.5, un proceso fundamental para la evaluación de productos y organismos GM. Es trascendental mencionar, por ejemplo, que en Brasil el cultivo de soya genéticamente modificada no estaba permitido, pero este cultivo ingresó de manera ilegal desde países vecinos como Argentina, por lo que el Estado debió realizar evaluaciones de los cultivos de soya y, al constatar que existían cultivos de soya GM, decidió aprobar este evento en su país

(“Soybeans”, 2008). Este es un ejemplo que demuestra que la prohibición no es la solución, más bien la regulación es la medida necesaria y suficiente para el control y manejo seguro de los organismos genéticamente modificados.

Los resultados obtenidos de las muestras 22 (Muestra de soya en grano de Latacunga de la Empresa Cereales La Pradera) y 23 (muestra de pasta de soya importada de Argentina) (Figuras 1 y 2) demuestran la presencia de soya genéticamente modificada en nuestro país, lo que representa una necesidad urgente de realizar evaluaciones con un número de muestras más amplio y además incluir otras especies que sean importadas de países donde cultivos genéticamente modificados han sido aprobados.

Basándonos en la publicación de Lübeck (n.f.), se decidió establecer el límite de detección en 0.01% y el límite de cuantificación en 0.1%. Las dos muestras positivas analizadas se encuentran sobre el valor de 0.1% por lo que se pudo determinar la concentración de ADN genéticamente modificado. La muestra positiva de soya en grano de Latacunga (muestra 22 en todas las figuras) tiene un porcentaje un poco mayor a 0.1%, mientras que la muestra de pasta de soya (muestra 23 en todas las figuras) se encuentra muy por encima del valor de 10% de OGM.

En las figuras 7 y 8, se puede observar que varias muestras tienen amplificación que corresponde tanto al promotor 35S como al terminador NOS. Estos resultados no pueden ser considerados positivos a pesar de tener producto de amplificación ya que la cuantificación de él nos indica que es menor al valor del límite cuantificación, 0.1% de OGM. Sin embargo, este resultado evidencia la presencia adventicia de semillas de soya transgénica presentes en lotes de semillas convencionales. Generalmente, la presencia adventicia no está relacionada con la bioseguridad, ya que el cultivo GM debió haber sido evaluado previamente por instituciones gubernamentales, pero en un país donde no existen tales instituciones, la presencia adventicia demuestra la presencia de granos de soya

transgénica que no han sido sometidos al proceso de análisis de riesgo por las razones mencionadas anteriormente.

La mayoría de países en la actualidad tienen métodos de detección validados y laboratorios certificados para estos objetivos. La validación de un método de detección es un proceso que demuestra que el conjunto de los procedimientos tanto de extracción de ADN, preparación de la muestra y corrida, y análisis de los resultados obtenidos presentará información precisa, confiable, reproducible y veraz. Las características de un protocolo para ser validado deben representar excelente precisión, eficiencia, exactitud, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Un nuevo método para ser validado debe ser ensayado en varios laboratorios para verificar la calidad de sus resultados (Lübeck, n.f.). En Europa, por ejemplo, existe la Unión Europea de Laboratorios de Referencia para alimentos y piensos modificados genéticamente, compuesta por más de 100 laboratorios especializados en análisis de OGMs y, que además, es responsable, entre otras cosas, de proveer a los laboratorios de referencia nacionales de métodos analíticos y reproducibles para la detección de organismos genéticamente modificados. En el Compendio de Métodos de Referencia para Análisis de OGMs se presenta 48 métodos cuantitativos y 31 métodos cualitativos (Joint Research Centre, 2010). Estos métodos se basan en la detección de varios tipos de secuencias de ADN. Las secuencias específicas al promotor/gen/característica son secuencias que se limitan a una determinada entidad molecular, como el promotor 35S; las secuencias específicas a un constructo son secuencias de ADN que abarcan dos entidades moleculares, como una parte del promotor y una parte del gen de interés insertado; las secuencias específicas a eventos son secuencias que contienen parte del genoma ligado a la secuencia insertada, y las secuencias específicas a la especie o al taxón son secuencias, que como su nombre lo indica, se limitan a una taxón o especie (Joint Research Centre, 2010; Lübeck, n.f.).

De los 48 métodos cuantitativos presentados en este compendio, todos fueron estandarizados con la tecnología TaqMan. Como se mencionó en la introducción, este es el más preciso y más fiable de los métodos, pero también el más costoso. Muchos autores han usado esta tecnología para estandarizar los protocolos de detección. Corbisier *et al* (2005), evaluaron la precisión del PCR en tiempo real mediante sondas TaqMan en alimentos procesados, al someter polvo de granos de soya Roundup Ready a diferentes procesos de fragmentación de ADN. Por otro lado, Vaïtilingom *et al* (1999), estandarizaron un proceso de detección de maíz Maximier y Soya RR mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Sin embargo, Buh *et al* (2010), en su estudio realizan una comparación entre 9 diferentes métodos de PCR en tiempo real. Se menciona que las tecnologías más comúnmente usadas son TaqMan y SYBR Green, pero que al comparar las 9, ninguna parece ser significativamente mejor que las otras. Ellos especifican que el método de detección basado en SYBR Green, a pesar de presentar una alta tendencia a inhibir la PCR, puede funcionar igual que las otras metodologías pero que requiere una optimización previa del protocolo. Estos resultados fueron evidenciados en esta investigación ya que, una vez estandarizado el protocolo, se comprobó que la tecnología basada en SYBR Green permite buena detección y cuantificación de las muestras positivas. La razón por la que se eligió SYBR Green es debido a que el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad San Francisco de Quito cuenta con el termociclador para PCR en tiempo real que funciona con esta tecnología.

Hasta el momento no existe un método validado que sea capaz de determinar de manera sobresaliente todos los eventos transgénicos en una manera rápida y de bajo costo. Es importante mencionar, además, que las regulaciones de algunos países son más demandantes que otras, por lo que los métodos de detección pueden llegar a ser muy

costosos. Mientras más exacto se desea un protocolo, mayor es el costo y mayor es el tiempo necesario para la obtención de sus resultados (Lübeck, n.f.).

El protocolo de detección de OGMs mediante PCR en tiempo real con tecnología *SYBR Green* estandarizado en este estudio ha sido usado en varios laboratorios. Barbau-Piednoir *et al* (2009), por ejemplo, compararon dos pares de primers para la detección del promotor 35S y dos pares de primers para la detección del terminador NOS y analizaron las diferencias en los resultados obtenidos con cada uno de los 4 métodos comparados. Uno de los pares de primers usados en ese estudio fue elegido para esta investigación. Siew-Ping, Yoke-Kqueen y Son, (2011) realizaron una evaluación de soya genéticamente modificada en 122 muestras de alimentos y concluyeron que el método de amplificación mediante SYBR Green produce resultados rápidos, reproducibles y estadísticamente sensitivos para la gran cantidad de muestras analizadas. Además aclararon que Malasia, a partir de los resultados obtenidos en el estudio, implementará regulaciones de etiquetado de alimentos que contienen ingredientes provenientes de OGMs y que el protocolo estandarizado facilitará el proceso de detección de OGMs a mayor escala.

Este estudio se basó en secuencias específicas al promotor y terminador y, al ser estas secuencias comunes para varios OGMs, es necesario que los eventos de las muestras positivas sean identificados. Es muy posible que la soya positiva para la presencia de los elementos analizados pertenezca al evento GTS 40-3-2, ya que es el evento predominante en los países de donde se importa soya al Ecuador; sin embargo, James (2010) menciona que existen 14 eventos de soya GM aprobados en distintos países, pero en la bibliografía se encuentran 10 eventos aprobados (“Status of Dossiers”, 2010 y “Listing of Query Results”, n.f.) (Anexo 3) y no todos contienen los elementos amplificados en este estudio. Por ejemplo, el evento A2704-12 producido por la empresa Bayer CropSciences tiene promotor 35S pero no tiene terminador TNOS, el evento MON-89788 no tiene el promotor

35S ni el terminador NOS (Barbau-Piednoir *et al*, 2009). Lo importante de esta información es que se demuestra que 6 de los 10 eventos aprobados pueden ser evaluados mediante la metodología estandarizada en este estudio, pero los resultados obtenidos tras la PCR en tiempo real demuestra que las muestras de soya GM pueden pertenecer a dos eventos distintos: MON 04032 o DD 026005-3 ya que las dos transformaciones contienen tanto el promotor 35S como el terminador NOS.

A partir del material de referencia certificada, se realizaron diluciones seriadas, como se menciona en la investigación realizada por Cankar *et al* (2006). Es importante aclarar que, debido a la variación entre corridas, las muestras estándares fueron incluidas en cada análisis por duplicado para verificar la eficiencia y posibilitar la cuantificación de las muestras positivas. Este es un factor de gran relevancia ya que se pudo observar que, a pesar de usar las mismas diluciones varias veces y las mismas condiciones, la eficiencia de la reacción varió de una corrida a otra. Puede deberse a errores en el pipeteo de los reactivos o a las condiciones ambientales externas al equipo, como la temperatura del laboratorio. Es primordial aclarar que el instrumento, donde se lleva a cabo la reacción de PCR en tiempo real, toma el aire del laboratorio y lo interioriza para los pasos de enfriamiento y calentamiento de las muestras, por lo que si la temperatura ambiental es muy alta, el equipo tardará más tiempo para enfriarse o la eficiencia de la reacción de amplificación podría disminuir (Bio-Rad, n.f.). En las pruebas preliminares realizadas para la estandarización del protocolo para la detección de OGMs mediante PCR en tiempo real, se pudo observar que la eficiencia de la reacción de amplificación variaba constantemente, a pesar de que las condiciones del programa y de la mezcla de la reacción eran las mismas en todas las corridas.

Debido a que los eventos de soya genéticamente modificada tiene 1 sola copia del promotor, gen EPSPS y del terminador, la cuantificación mediante la amplificación de los

elementos promotor y terminador es un método viable y conveniente, a diferencia del maíz que existen ciertos eventos que pueden llegar a tener hasta 4 copias del promotor. Los resultados de la realización de métodos de cuantificación mediante amplificación del promotor en ese caso, podrían sobreestimar la cantidad de OGM presente en la muestra analizada (Lübeck, n.f.).

Cuando un producto alimenticio, tras su evaluación en busca de OGM, da positivo, los pasos a seguir son verificar mediante PCR en tiempo real a qué evento transgénico pertenece para así comprobar si se cumple la legislación vigente (si la modificación genética ha sido aprobada en el país donde se realiza el análisis y si la cantidad autorizada de OGM presente en el alimento es cumplida). Para que este tipo de evaluaciones puedan ser realizadas en el país, es primordial instaurar instituciones especializadas en análisis de detección y de identificación de eventos específicos.

Vale la pena recalcar que la soya de Cereales La Pradera que resultó positiva para la presencia de elementos presentes en organismos genéticamente modificados (P35S y TNOS) al no tener una etiqueta de producto GM no cumple con la Ley de Defensa del Consumidor y la Ley Orgánica de Salud, por lo que es importante que se realicen análisis de detección para que el cumplimiento de esta ley sea verificado. Es trascendental mencionar que el etiquetado es simplemente una forma de garantizar libertad de elección para los consumidores que desean o no consumir organismos genéticamente modificados. Los umbrales que se han establecido en varios países han servido para diferenciar la presencia involuntaria de OGMs en lotes convencionales, como producto de la mezcla entre distintos campos y cultivos durante el transporte y producción, y la presencia intencional de OGMs en un producto o cultivo. Este argumento es esencialmente social y político, ya que la presencia de OGM en mayor o menor cantidad en un cultivo o producto, científicamente no tiene ningún efecto indeseable en la salud humana o en el ambiente.

Después de la evaluación de cultivos transgénicos en nuestro país, será necesario realizar un análisis de la legislación existente y plantear nuevos y sensatos objetivos que tengan coherencia y que representen las necesidades de la sociedad ecuatoriana de acuerdo al contexto actual para no solo cumplir con una regulación validada de la manipulación de estos organismos, sino también una plan que especifique los límites de detección y de cuantificación, de acuerdo a los métodos internacionalmente validados y a la realidad del país.

Finalmente, los resultados de este estudio demuestran que las leyes sobre el etiquetado de OGMs no se cumplen en el país debido a que dos muestras de las veinte y seis analizadas son positivas para la presencia del P35S y del TNOS, y no presentaban etiqueta de OGMs como la regulación ecuatoriana lo especifica. Además, los resultados evidencian la presencia de semillas GM en el territorio ecuatoriano al tener en cuenta la presencia adventicia en varias muestras evaluadas. Adicionalmente, es importante destacar que la metodología estandarizada dio excelentes resultados, los mismos que fueron confirmados mediante PCR en punto final y PCR en tiempo real. Con la evidencia de la presencia de soya transgénica en el territorio nacional, se genera la necesidad de desarrollar un equipo de gente especializada en el tema de bioseguridad y con la capacidad de detectar, identificar y cuantificar organismos genéticamente modificados en cultivos y alimentos.

10. Conclusiones

Se logró estandarizar un protocolo de detección de soya transgénica mediante la amplificación de secuencias específicas del promotor 35S y del terminador NOS mediante PCR en tiempo real, cuyas condiciones de la reacción y del programa de amplificación son especificadas en la sección 7.5.

El método de detección de OGM en granos de soya mediante PCR en tiempo real permitió monitorear el incremento en fluorescencia durante la amplificación y así, estimar la presencia del producto específico en las muestras positivas.

Los resultados positivos obtenidos en la detección por PCR convencional fueron confirmados por los resultados obtenidos en la detección mediante PCR en tiempo real, ya que las 2 muestras (la muestra 22, soya en grano de Latacunga de la empresa Cereales la Pradera comprada en un supermercado en Quito, y la muestra 23, pasta de soya importada de Argentina) demostraron la presencia de las secuencias amplificadas en los dos tipos de PCR.

De las 26 muestras analizadas, 2 muestras (la muestra 22, soya en grano de Latacunga de la empresa Cereales la Pradera comprada en un supermercado en Quito, y la muestra 23, pasta de soya importada de Argentina) contienen un porcentaje mayor a 0.1% de OGM.

Se demostró la presencia adventicia de semillas de soya GM en varias muestras analizadas, indicando la presencia de soya genéticamente modificada en el territorio nacional.

11. Recomendaciones

Realizar un estudio basado en esta metodología incluyendo la mayor cantidad de muestras posibles, no solo de centros de acopio de Los Ríos, ya que, a pesar de ser la provincia con mayor producción en el Ecuador, el Guayas también tiene cultivos importantes de soya, e incluir, además, muestras comercializadas en todo el territorio nacional y productos derivados de este cultivo para comprobar si la Ley de Defensa del Consumidor y la Ley Orgánica de Salud se cumplen.

Analizar mediante PCR en tiempo real otros cultivos que son importados de países donde eventos transgénicos han sido aprobados.

Estandarizar un protocolo de detección de OGMs mediante PCR en tiempo real basado en amplificación de primers específicos para cada evento para realizar una identificación de los eventos existentes en nuestro territorio.

El Ecuador debe establecer un marco regulatorio del manejo de organismos genéticamente modificados e instituir un organismo especializado en controlar y hacer cumplir las regulaciones establecidas en el país.

12. Bibliografía

Álvarez, E., J. Castellanos y C. Maldonado. “Manual de procedimientos de laboratorios para detección de organismos genéticamente modificados”. Proyecto GEF-BM “Desarrollo de capacidades para implementar en Colombia el Protocolo de Cartagena en Bioseguridad. Convenio de la Diversidad Biológica”. Instituto de Investigaciones de Recursos Bibliográficos Alexander Von Humboldt. Agosto 2007. 24 abril 2011. Bogotá. Colombia.

<<http://www.bch.org.co/bioseguridad/doc/ManualLaboratorioOGM.pdf>>

“Análisis de Detección de Organismos Genéticamente Modificados”. Laboratorio de Detección de OGMs. Instituto de Biotecnología. INTA. 2002. 26 marzo 2011. Argentina. <http://www.inta.gov.ar/biotec/servicios/deteccion_ogm.htm>

Barbau-Piednoir, E. *et al.* “SYBR_Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products”. European Food Research and Technology. Springer. 7 November 2009. 23 abril 2010.

Bio-Rad. “CFX96 Real-Time PCR Detection System”. Gene-Quantification. n.f. 11 mayo 2011. <<http://www.gene-quantification.de/bio-rad-CFX96-bulletin-5589.pdf>>

“Biosafety Expert”. Biosafety Clearing-House. Convention on Biological Diversity. 3 julio 2009. 11 mayo 2011.

<<http://bch.cbd.int/database/record-v4.shtml?documentid=100158>>

Buh, M. *et al.* “Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection”. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Springer-Verlag. 20 enero 2010. 24 marzo 2011.

Cankar, K. *et al.* “Critical points of ADN quantification by real-time PCR – effects of ADN extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms”. BMC Biotechnology. 14 agosto 2006. 20 marzo 2011. Eslovenia.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1569826/?tool=pub med>>

Congreso Nacional. “Ley Orgánica de Defensa del Consumidor (Ley No. 2000-21)”. Ministerio de Industrias y Productividad. n.f. 20 abril 2011. Quito. Ecuador.

<http://www.micip.gov.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=458&Itemid=135>

Congreso Nacional. “Ley Orgánica de Salud”. Bioética.org. 22 diciembre 2006. 20 mayo 2011, Quito. Ecuador. <http://www.bioetica.org.ec/c_ley_salud.pdf>

“Constitución del Ecuador”. Asamblea Constituyente. 2008. 9 julio 2009. Ecuador.

<http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf>

“Consulta de Totales por Nandina - País”. Banco Central Del Ecuador. Comercio Exterior. 2010. 22 septiembre 2010.

<http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/seguridad/ComercioExteriorEst.jsp>

Corbisier, P. *et al.* “Quantitative determination of Roundup Ready Soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour”. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Springer-Verlag. 10 agosto 2005. 24 marzo 2011. Bélgica.

Departamento Agricultura FAO. “Patrones”. Depósito Documentos de la FAO. 1996. 25 abril 2011. <<http://www.fao.org/docrep/T0845S/t0845s0c.htm>>

Elenis, D. *et al.* “Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms”. Analytical and Bioanalytical Chemistry. SpringerLink. 2 febrero 2008. 18 marzo 2011. Grecia.

<<http://www.springerlink.com/content/p742733g55724783/>>

“El cultivo de soya”. Ecuaquímica. 2010. 23 septiembre 2010.

<http://www.ecuaquimica.com/index.php?option=com_content&task=view&id=31&Itemid=99999999&lang=es>

James, C. “Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009”. ISAAA. Brief No. 41. 2009. 6 septiembre 2010. Ithaca, NY.

James, C. “Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010”. ISAAA. Brief No. 42. 2010. 11 noviembre 2010. Ithaca, NY

Joint Research Centre. *Compendium of reference methods for GMO analysis*. European Union Reference Laboratory for GM food and feed y European Network of GMO Laboratories. Italia. Luxembourg: Publications Office, noviembre 2010.

Karudapuram, S. y D. Batey. “Detection of Genetically Modified Soybean in Processed Foods Using Real-Time Quantitative PCR with SYBR Green I Dye on the DNA Engine Opticon 2 System”. Bio-Rad. n.f. 25 abril 2011. San Francisco. Estados Unidos.

<<http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/1131/Detection-Of-Genetically-Modified-Soybean-In-Processed-Foods-Using-Real-Time-Quantitative-PCR-With-SYBR-Green-I-Dye-On-The-DNA-Engine-Opticon-2-System.html>>

Kodama, T. et al. “Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean”. National Food Research Institute. n.f. 26 marzo 2011. Japón.

<http://www.nfri.affrc.go.jp/research/katsudo/pdf/2010/AOAC_poster_kitta.pdf>

“Ley de Gestión Ambiental”. Congreso Nacional. 30 julio 1999. 25 abril 2011. Ecuador.

<<http://www.conelec.gob.ec/images/documentos/LEY%20DE%20GESTION%20AMBIENTAL.doc>>

“Listing of Query Results. Soybean”. Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database. n.f. 20 abril 2011.

<http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=Submit&hstID_XCode=8>

Lipp, M. *et al.* “IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in dried powder”. Journal of AOAC International. 23 diciembre 1999. 24 marzo 2011

Lübeck, M. “Detection of genetically modified plants – methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products”. Skov- og Naturstyrelsen. n.f. 17 marzo 2011. <<http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm>>

Monsanto. “Updated Molecular Characterization and Safety Assessment of Roundup Ready. Soybean Event 40-3-2”. Center for Environmental Risk Assessment. 7 junio 2000. 23 abril 2011. St. Louis.

“MON- Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2)”. Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database. 4 abril 2009. 20 abril 2011.

<http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database&mode=Submit&evidx=25>

“MON-Ø4Ø32-6 - Roundup Ready™ soybean”. Biosafety Clearing House. 8 septiembre 2010. 28 septiembre 2010.

<<http://bch.cbd.int/database/record-v4.shtml?documentid=14796>>

“More people than ever are victims of hunger”. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 19 junio 2009. 9 julio 2009. Roma.

<http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/Press%20release%20june-en.pdf>

“Partes en el Protocolo. Situación de Ratificación y Entrada en vigencia”. Convenio sobre la Diversidad Biológica. Biosafety Clearing House. 2011. 8 mayo 2011.

<<http://bch.cbd.int/protocol/parties/>>

“Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la Diversidad biológica”. 2000. 10 noviembre 2009. Montreal.

<<http://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-es.pdf>>

“¿Qué es la biotecnología?”. *Council for Biotechnology information*. NF. 09 de noviembre de 2008. México.

<<http://www.whybiotech.com/mexico.asp>>

Querci, M. “Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión n° 2. Presentación del Manual, Métodos de Trabajo e Introducción del Curso”. Joint Research Center. Institute for Health and Consumer Protection. n.f. 26 marzo 2011.

<<http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>>

Querci, M y M. Mazzara. “Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión n° 7. Características de la Soja *Roundup Ready*, del Maíz MON810 y del Maíz Bt-176”. Joint Research Center. Institute for Health and Consumer Protection. n.f. 25 marzo 2011.

<<http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>>

Querci, M y M. Mazzara. “Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión n° 8. Características de los Sistemas Cualitativos de PCR descritos en el Manual”. Joint Research Center. Institute for Health and Consumer Protection. n.f. 25 marzo 2011.

<http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n8.pdf>

Roche. “LightCycler 480 SYBR Green I Master”. Roche Applied Science. febrero 2008. 28 septiembre 2010. Alemania.

<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4707516a.pdf>

SEABA. “Acta 07 de 2005”. Ministerio De La Protección Social. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Invima. 9 diciembre 2005. 28 septiembre 2010. <http://bch.biodiv.org/database/attachedfile.aspx?id=1000>

Siew-Ping, K., C. Yoke-Kqueen y R. Son. “Quantitative analysis of Roundup Ready soybean content in soy-derived food and animal feed by using Real-time PCR incorporated with cloned DNA fragments”. International Food Research Journal. 2011. 25 abril 2011. Malasia.

[http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(02\)%202011/\(6\)%20IFRJ-2010-108.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(02)%202011/(6)%20IFRJ-2010-108.pdf)

SIGAGRO. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. 2010.

“Soybeans”. GMO Compass. 3 diciembre 2008. 25 marzo 2011. Estados Unidos de América.

http://www.gmo-compass.org/eng/groceryshopping/crops/19.geneticallymodified_soybean.html

“Status of Dossiers”. European Commission Joint Research Centre. European Union Reference Laboratories of GM Food and Feed. 4 agosto 2010. 20 septiembre 2010. Unión Europea. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>

“TaqMan Principles”. Facultad de Medicina de la Universidad de Carolina del Norte. n.f. 26 marzo 2011. <http://www.med.unc.edu/anclinic/Tm.htm>

Tengel, C. *et al.* “PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs”. *BioTechniques*. agosto 2001. 26 marzo 2011. Alemania.

<http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/01312pf01_11584a.pdf>

Teichert, S. y M. André. “Límites de Tolerancia para Semillas Adventicias”. *SeedNews*. Septiembre de 2009. 26 abril 2011. Brasil.

<http://www.seednews.inf.br/html/site_es/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=39>

“The Polymerase Chain Reaction in GMO detection”. *TAGEM*. n.f. 24 abril 2011. Turquía.

<<http://www.tagem.gov.tr/HABERLER/cartegena/gcm%20analizi/PCR.pdf>>

Tozzini, A. *et al.* “Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification”. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.3 No.2, May 15, 2000. 12 enero 2010. Valparaíso.

Uri, C. *et al.* “Validation of a method for the detection of genetically modified organisms”. *Cereal Research Communications*. 2007. 25 abril 2011. Hungría.

<<http://www.akademiai.com/content/a07l073231w55772/fulltext.pdf?page=1>>

Väitilingom, M. *et al.* “Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximier Maiza and Roundup Ready Soybean in some representative foods”. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 24 noviembre 1999. 26 marzo 2011. Suiza. <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf981208v>>

Villalobos, Víctor. *Los Transgénicos: Oportunidades y amenazas*. México, D.F.: Mundi-Prensa, 2008.

Weighardt, F. “Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión 10. PCR Cuantitativa para la Detección de OGM”. Joint Research Center. Institute for Health and Consumer Protection. n.f. 26 marzo 2011.

“World Statistics. Adoption of Biotech-enhanced Soybean Seedstock 1997-2009”. Soy Stats. The American Soybean Association. 2010. 21 septiembre 2010.

<<http://www.soystats.com/2010/Default-frames.htm>>

“III Censo Nacional Agropecuario - Resultados Nacionales”. Inec-Mag-Sica. 2000. 23 septiembre 2010.

<http://sigagro.flunal.com/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&item_id=236>

13. Tablas

Tabla 1. Lista de muestras de semillas de soya, soya en grano y pasta de soya analizadas

	Contacto	Lugar	Variedad	Fecha de obtención
1	Andrés Lertora	Buena Fe. Los Ríos	P34	07/10/2008
2	Luis Arteaga	Baba - Isla Bejucal. Los Ríos	306	07/10/2008
3	Francklin Mueckay	Valencia. Los Ríos	P34	07/10/2008
4	José Luis Vera	Febres Cordero. Mata Cacao. Los Ríos	306	07/10/2008
5	Rafael Ortiz	Quevedo. Los Ríos	P34	07/10/2008
6	Vilme Espinoza	Mocache. Los Ríos	P34	07/10/2008
7	Marco Acosta	Montalvo. Los Ríos	306	07/10/2008
8	MAGAP	Unidad Nacional de Almacenamiento		18/09/2009
9		Soya peruana comprada en Guayaquil. Guayas		21/6/2009
10		Chunchi. Azuay		21/6/2009
11		Babahoyo. Los Ríos		21/6/2009
12		Soya nacional comprada en Guayaquil. Guayas		21/6/2009
13	José Macías	AGRIPAC. Guayaquil. Guayas	P34	03/09/2009
14		Recinto Mata de Cacao. Babahoyo. Los Ríos	Júpiter	19/10/2009
15		Montalvo. Babahoyo. Los Ríos	P34	19/10/2009
16		Bucay. Guayas		14/10/2009
17		Soya importada por Importadora Granos del Campo		19/1/2009
18		Babahoyo. Los Ríos	P34	21/10/2009
19		Babahoyo. Los Ríos	307	21/10/2009
20	INIAP	Pichilingue. Los Ríos	307	10/01/2010
21		Soya de Lasso comprada en Centro Naturista Quicentro.		19/1/2009
22		Soya de Latacunga de Cereales La Pradera		19/1/2009
23		Pasta de soya importada de Argentina. PRONACA		06/10/2009
24		Soya de Riobamba comprada en Bucay. Guayas		14/10/2009
25		Ventanas Pueblo Viejo. Los Ríos	P34	19/10/2009
26	INIAP	Pichilingue. Los Ríos	308	10/01/2010

Tabla 2. Primers utilizados en esta investigación para la amplificación de P35S y TNOS y tamaño de amplicones.

Nombre de Primer	Secuencia Diana	Secuencia de Primer	Tamaño de amplicón
P35S-F	Promotor 35S CaMV	GAAGGTGGCTCCTACAAATGC	200pb
P35S-R		TAGTGGGATTGTGCGTCATCC	
TNOS-F	Terminador NOS	GATTAGAGTCCC GCAATTATACATTTAA	69pb
TNOS-R		TTATCCTAGGTTGCGCGCTATATTT	

Tabla 3. Concentraciones Reacción PCR Promotor 35S

PCR 35S	Concentración en Rxn
Agua	----
Buffer	1X
MgCl₂	2mM
dNTPs	0.5mM
Primers 35S	0.5μM
Taq polimerasa	1.5U
DNA	200ng

Tabla 4. Concentraciones Reacción Terminador NOS

PCR tNOS	Concentración en Rxn
Agua	----
Buffer	1X
MgCl₂	2mM
dNTPs	0.5mM
Primers 35S	0.5μM
Taq polimerasa	1.5U
DNA	200ng

Tabla 5. Cuantificación de ADN de muestras analizadas. El número de muestras corresponde al número de muestras de la Tabla 1.

Muestras	Cantidad de ADN						
1a	34.9	8a	51.9	15a	66.4	22a	38.9
1b	34.5	8b	48	15b	54.8	22b	51.7
1c	49.5	8c	48.7	15c	22	22c	43.9
2a	39.1	9a	28.7	16a	24.6	23a	117.7
2b	28.7	9b	19.66	16b	19.2	23b	56.6
2c	43.8	9c	22.2	16c	28.6	23c	21.3
3a	42.1	10a	24.6	17a	20.8	24a	44.7
3b	38.4	10b	20.2	17b	28.5	24b	1920.2
3c	28.5	10c	13.7	17c	32.8	24c	264.2
4a	23	11a	38.5	18a	41.2	25a	38.5
4b	28.7	11b	47.2	18b	31.1	25b	36.6
4c	44.6	11c	45.8	18c	28.1	25c	24.7
5a	21.9	12a	35.9	19a	48	26a	52.1
5b	33.8	12b	23.3	19b	31.9	26b	26.1
5c	36.4	12c	24.8	19c	35.6	26c	38.4
6a	26.9	13a	39.8	20a	44.9		
6b	23.4	13b	75	20b	24.4		
6c	22.5	13c	45.8	20c	35.6		
7a	33.3	14a	66.4	21a	36.1		
7b	42.5	14b	28.2	21b	21.6		
7c	45	14c	43.5	21c	33.9		

14. Figuras

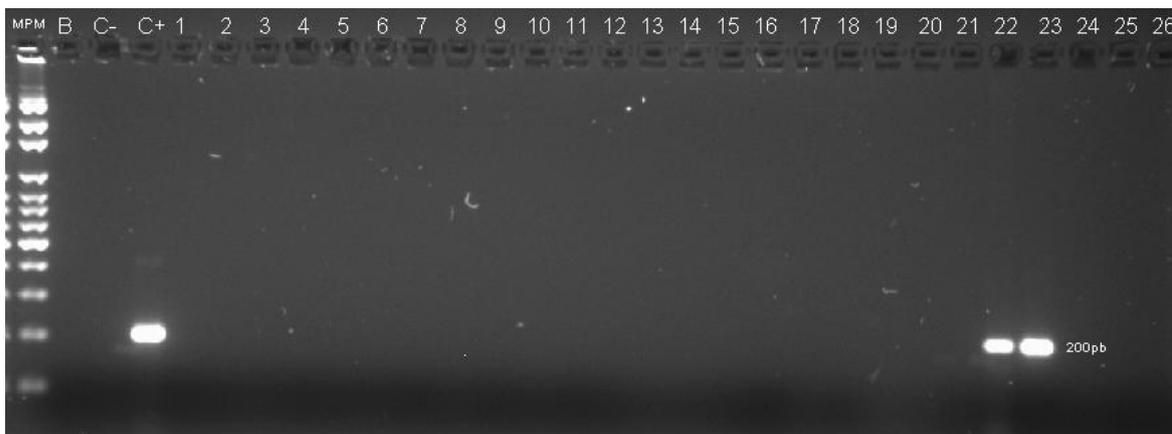


Figura 1. Resultados de amplificación del promotor 35S mediante PCR en punto final. Tamaño de amplicón de 200pb. Muestras positivas: Control positivo, muestra 22 y muestra 23. (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).

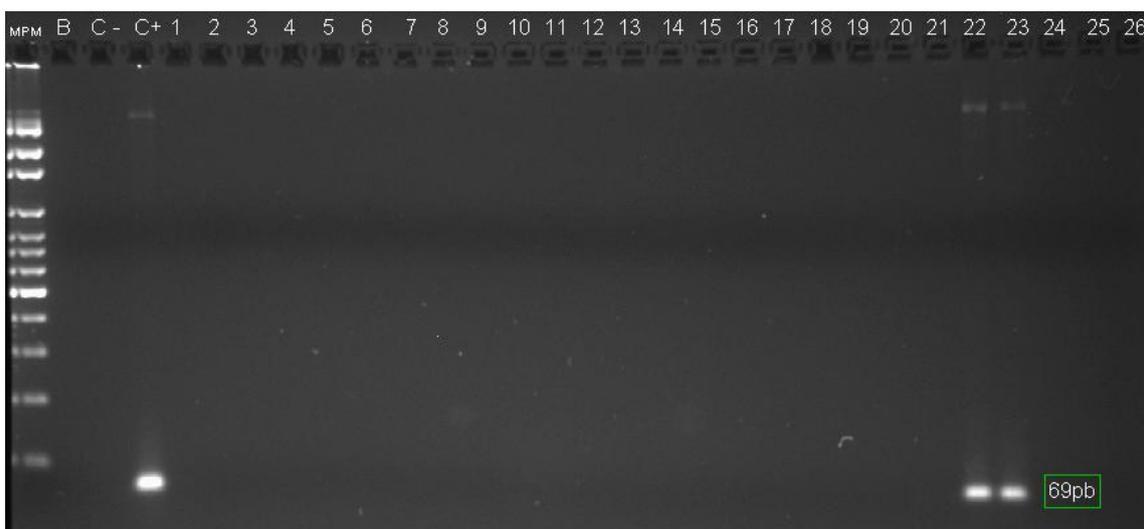


Figura 2. Resultados de amplificación del terminador NOS mediante PCR en punto final. Tamaño de amplicón de 69pb. Muestras positivas: Control positivo, muestra 22 y muestra 23. (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).

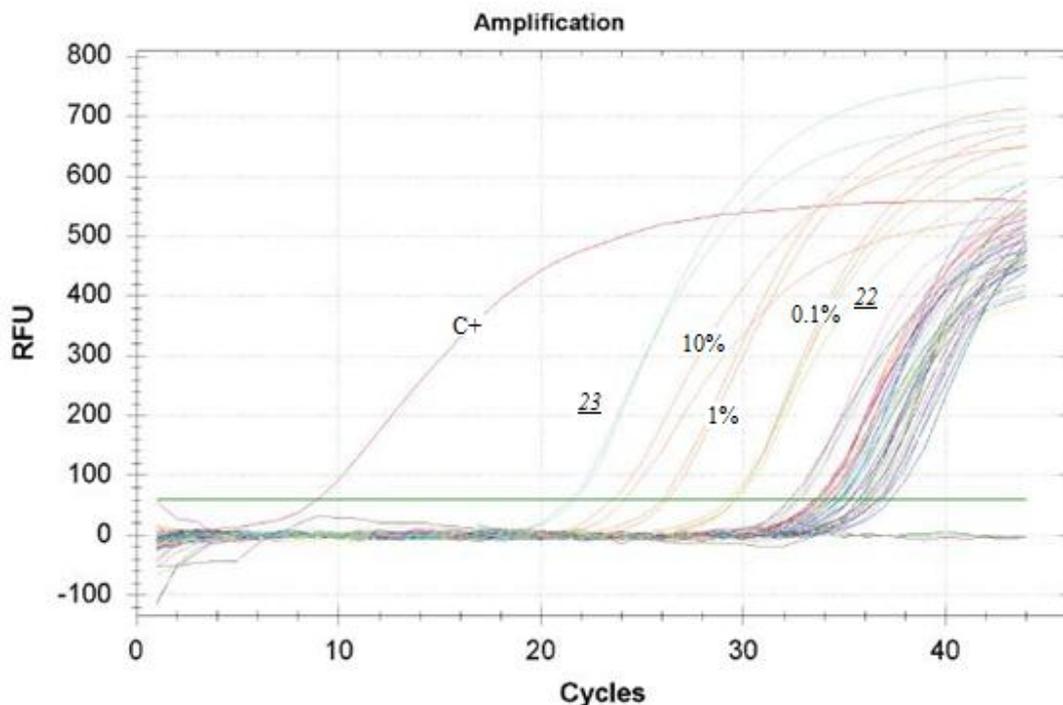


Figura 3. Curvas de Amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. C+, muestra 23, muestras estándares con 10%, 1% y 0.1% de soya GM y muestra 22 son las muestras con cantidad de producto amplificado detectable y cuantificable. (RFU = Unidades de Fluorescencia)

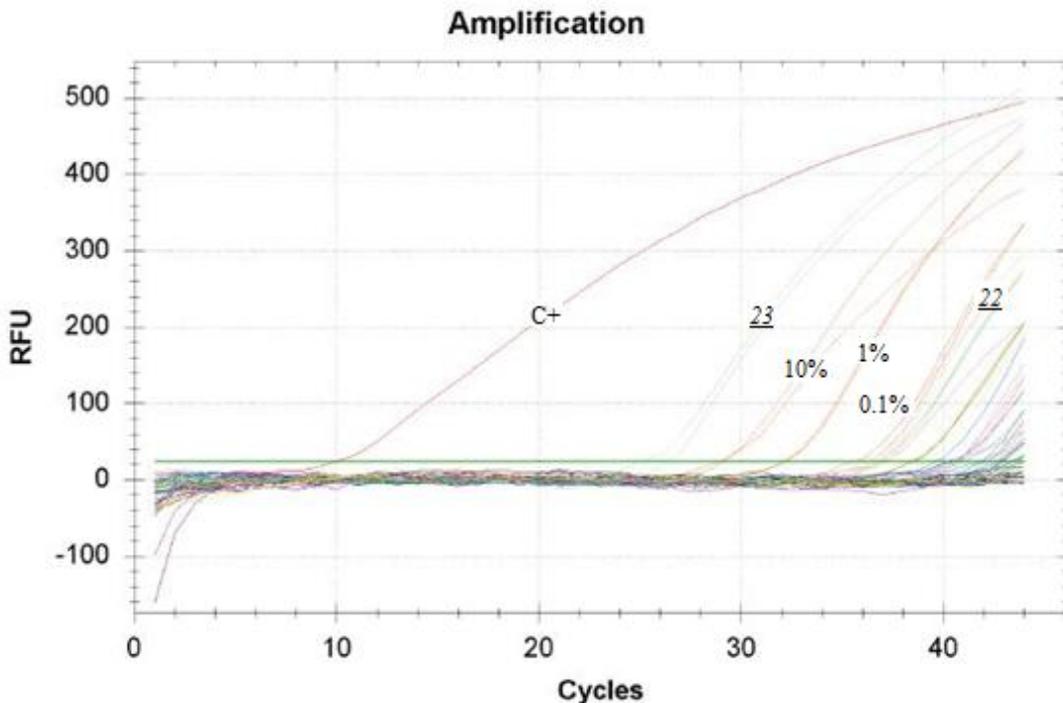


Figura 4. Curvas de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. C+, muestra 23, muestras estándares con 10%, 1% y 0.1% de soya GM y muestra 22 son las muestras con cantidad de producto amplificado detectable y cuantificable. (RFU = Unidades de Fluorescencia)

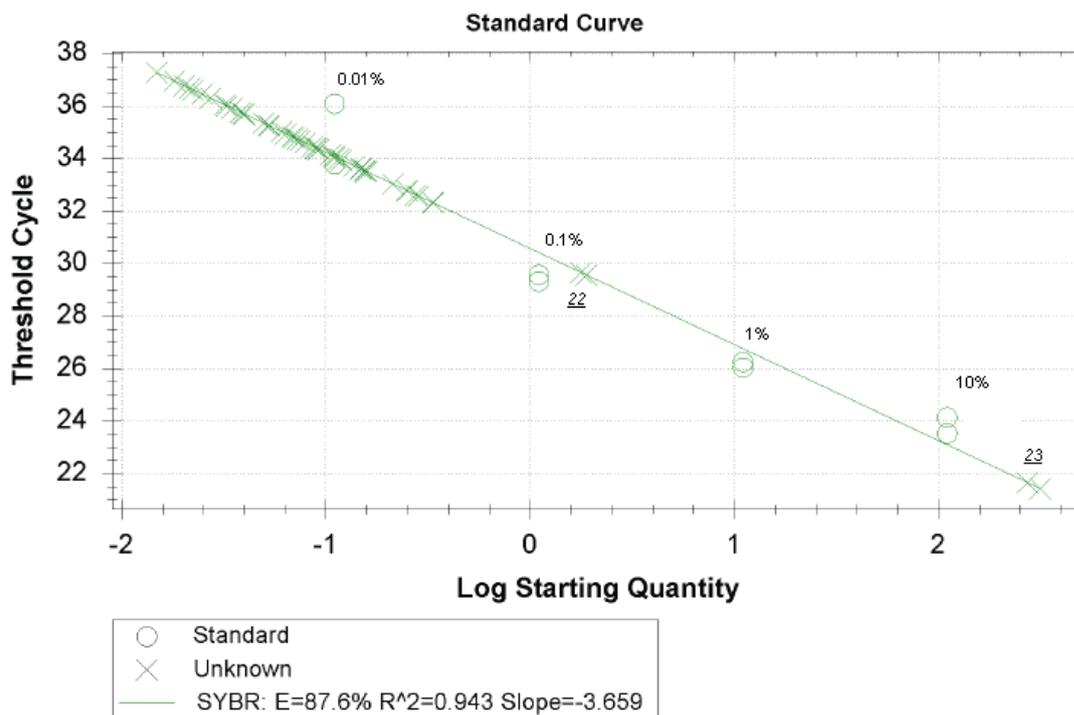


Figura 5. Curva estándar de amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01%, 0.1%, 1% y 10%), Las X representan a las 26 muestras por duplicado

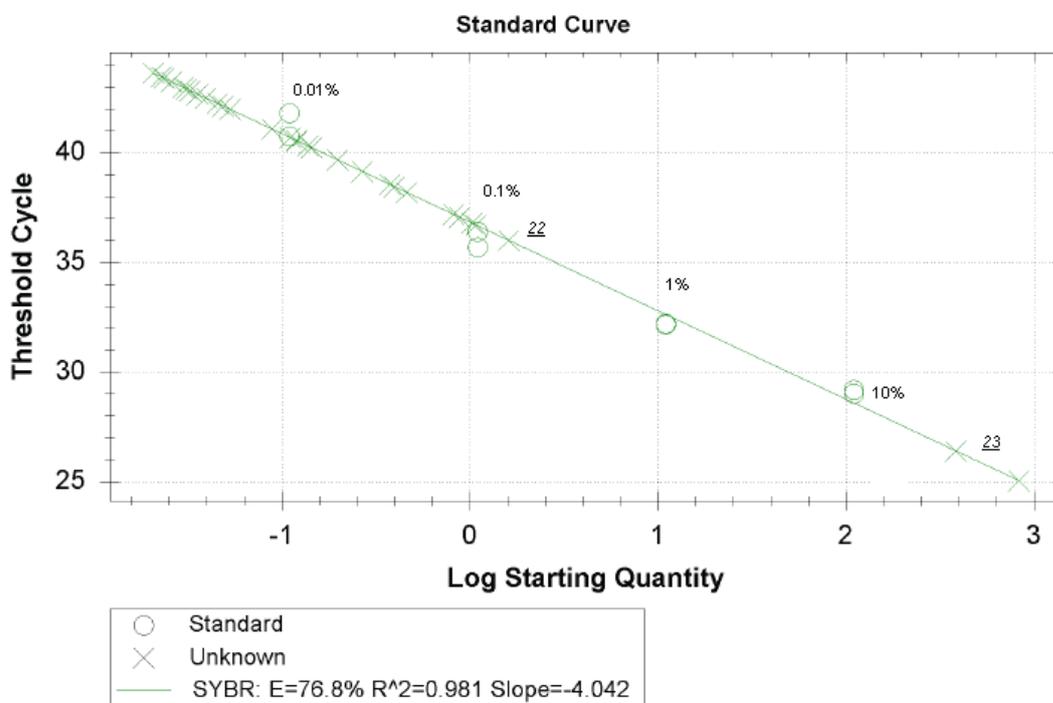


Figura 6. Curva estándar de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01%, 0.1%, 1% y 10%), Las X representan a las 26 muestras por duplicado

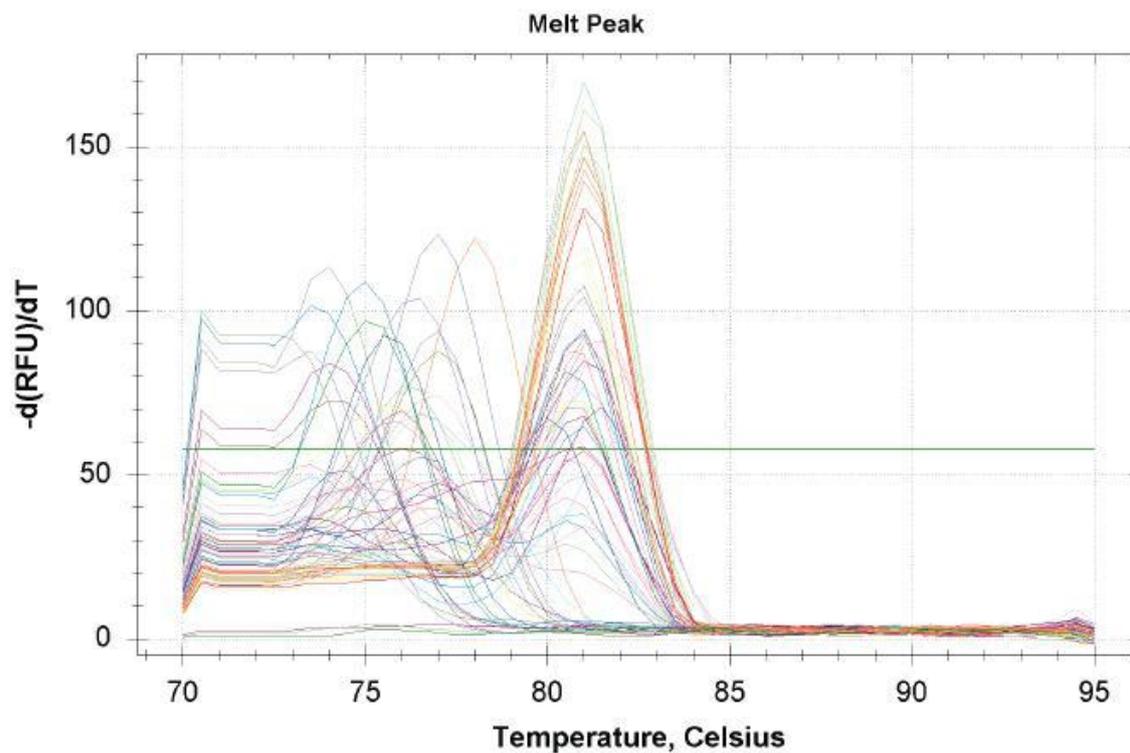


Figura 7. Picos de Disociación de Amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Temperatura de disociación de producto diana amplificado: 81°C. Dímeros de primer y producto inespecífico con temperaturas desde 73°C hasta 78°C.

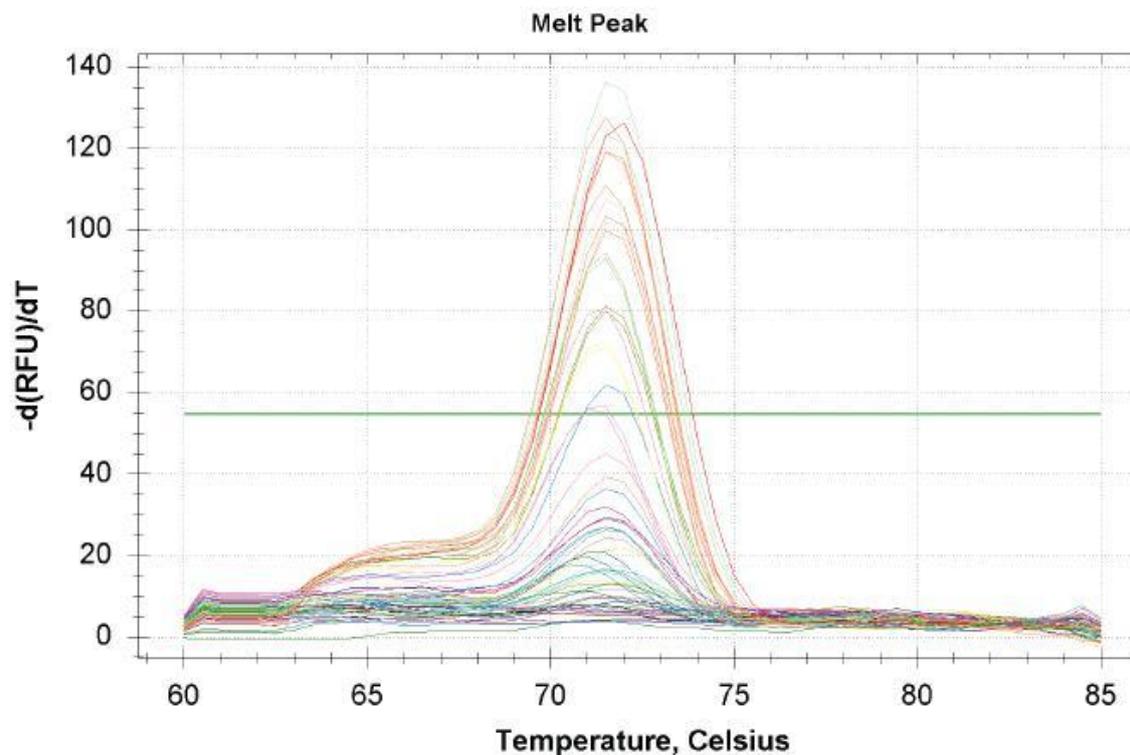


Figura 8. Picos de Disociación de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Temperatura de disociación del producto diana amplificado: 71.5°C. Dímeros de primer con temperatura desde 64°C hasta 68°C.

15. Anexos

Anexo. 1. Área Global de Cultivos Transgénicos de 2010: por país (millones de hectáreas)

	País	Área (millones de hectáreas)	Cultivos transgénicos
1	Estados Unidos	66,8	Maíz, soja, algodón, colza, remolacha, azucarera, alfalfa, papaya y calabaza
2	Brasil	25,4	Soja, maíz y algodón
3	Argentina	22,9	Soja, maíz y algodón
4	India	9,4	Algodón
5	Canadá	8,8	Colza, maíz, soja y remolacha azucarera
6	China	3,5	Algodón, tomate, álamo, papaya y pimiento dulce
7	Paraguay	2,6	Soja
8	Pakistán	2,4	Algodón
9	Sudáfrica	2,2	Maíz, soja y algodón
10	Uruguay	1,1	Soja y maíz
11	Bolivia	0,9	Soja
12	Australia	0,7	Algodón, Colza
13	Filipinas	0,5	Maíz
14	Myanmar	0,3	Algodón
15	Burkina Faso	0,3	Algodón
16	España	0,1	Maíz
17	México	0,1	Algodón y soja
18	Colombia	<0.1	Algodón
19	Chile	<0.1	Maíz, soja y cáñola
20	Honduras	<0.1	Maíz
21	Portugal	<0.1	Maíz
22	República Checa	<0.1	Maíz y patata
23	Polonia	<0.1	Maíz
24	Egipto	<0.1	Maíz
25	Eslovaquia	<0.1	Maíz
26	Costa Rica	<0.1	Algodón y soja
27	Rumanía	<0.1	Maíz
28	Suecia	<0.1	Patata
29	Alemania	<0.1	Patata
	TOTAL	148	

(James, 2010)

**Anexo 2. Lista de países donde se han realizado aprobaciones regulatorias del evento
GTS 40-3-2.**

País	Ambiente	Alimento humano y animal	Alimento humano	Alimento animal	Comercialización
Argentina	1996		1996	1996	
Australia			2000		
Brazil	1998		1998	1998	
Canada	1995		1996	1995	
China		2004			
Colombia		2005			
Czech Republic			2001	2001	2001
European Union		2005			1996
Japan	1996		1996	1996	
Korea			2000	2004	
Mexico	1998		1998	1998	
Paraguay	2004	2004			
Philippines			2003	2003	
Russia			1999		1999
South Africa	2001		2001	2001	
Switzerland			1996	1996	
Taiwan			2002		
United Kingdom			1996	1996	
United States	1994	1994			
Uruguay	1997		1997	1997	

("MON- Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2)", 2009)

Anexo 3. Lista de eventos de soya en el mundo y presencia de P35S y TNOS

	Evento	Empresa productora	Estado de Validación	P35S	TNOS
1	A2704-12	Bayer CropScience	Completo	Si	No
2	MON 04032-6	Monsanto	Completo	Si	Si
3	MON 89788	Monsanto	Completo	No	No
4	A5547-127	Bayer CropScience	Completo	Si	No
5	DP-305423-1	Pioneer Hi-Bred	Completo	No	No
6	DP-356043-5	Pioneer Hi-Bred	Completo	No	No
7	DP-305423 x MON 40-3-2	Pioneer Hi-Bred	Reporte en proceso	Si	Si
8	BPS-CV-127-9	BASF Plant Sciences	Reporte en proceso	No	No
9	MON 87701	Monsanto	Reporte en proceso	No	No
10	MON 87701 x MON 89788	Monsanto	Reporte en proceso	No	No
11	MON 87769	Monsanto	Pruebas experimentales en proceso	No	No
12	MON 87705	Monsanto	Evaluación Científica en proceso	No	No
13	DD 026005-3	DuPont Canada Agriculture Products	Completo	Si	Si
14	ACS-GM003-1	Bayer CropScience	Completo	Si	No
15	OT96-15	Agriculture and Agri-Food Canada	Completo	No	No
16	ACS-GM001-8	Bayer CropScience	Completo	Si	No

(Modificado de "Status of Dossiers", 2010 y "Listing of Query Results", n.f.)