

## **Detección e identificación de eventos asociados a organismos vivos modificados en semillas de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela empleando métodos de inmunoensayo y análisis por PCR**

**Luis Díaz<sup>1\*</sup> y Iván Galindo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Oficina Nacional de Diversidad Biológica, Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. Caracas, D.C. Venezuela

<sup>2</sup> Dirección de Agricultura y Soberanía Alimentaria, Instituto de Estudios Avanzados. Caracas, D.C. Venezuela

### **RESUMEN**

Con el fin de detectar eventos asociados a organismos vivos modificados (OVM) en semillas comerciales de maíz en Venezuela, se realizó un muestreo del 70% de cultivares de maíz sembrados en 2011, indicados en la lista de cultivares elegibles del Servicio Nacional de Semillas, constituido por doce cultivares comerciales y dos cultivares empleados por pequeños agricultores del país. Los ensayos se iniciaron con la aplicación de tiras de flujo lateral para estudiar las proteínas Cry1Ab, Cry 3Bb y CP4 EPSPS. Posteriormente, se desarrollaron los ensayos basados en ADN, con los cuales se evaluó la presencia del gen de la invertasa del maíz (control positivo interno), para después aplicar la estrategia de detección primaria empleando secuencias de cebadores que anclan en la región común a varias secuencias transgénicas. Del ensayo basado en proteínas se logró detectar una muestra que contenía la proteína Cry 1Ab, mientras que en los ensayos basados en ADN permitieron identificar, en la misma muestra, secuencias promotoras y terminadoras de transgenes. Finalmente, se logró la identificación del evento específico DAS-Ø15Ø7-1, el cual proviene de líneas transgénicas que le confieren al cultivo de maíz resistencia a herbicida y tolerancia a insectos lepidópteros. Se tiene así el primer reporte en Venezuela del uso de semillas comerciales OVM en cultivos de maíz.

**Palabras clave:** detección, maíz, organismos vivos modificados, semillas.

### **Detection and identification of events associated to living modified organisms in corn seeds (*Zea mays* L.) in Venezuela by immunoassay and PCR analysis**

### **ABSTRACT**

With the aim to detect DNA sequences associated to living modified organisms (LMO) in commercially available corn seeds, it was made a sampling covering 70% of corn cultivars planted in Venezuela in 2011. This sampling included twelve commercial materials, and two cultivars from small-scale farmers. The first detection assay applied consisted in the application of lateral flux immune test strips to reveal the presence of the proteins Cry1Ab, Cry 3Bb y CP4 EPSPS. After these assays, DNA-base analysis methods were done to evaluate the presence of DNA sequences associated, such as the maize invertase gene. The protein immune-detection assay was able to identify a sample containing Cry 1Ab, while DNA-based PCR tests allowed us to detect, in the same sample, DNA sequences

---

\*Autor de correspondencia:

E-mail: alexanderdiazm7@gmail.com

associated with transgenesis that finally turned out to be the specific event DAS-Ø15Ø7-1, which confers herbicide resistance and insect (Lepidopterae) tolerance. As far as we know, this is the first report that demonstrates the use of genetically modified corn seeds in Venezuela.

**Key words:** Detection, corn, living modified organisms, seeds.

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) se originó en una parte restringida de México (Bejarano y Segovia, 2000). De todas las plantas cultivadas, el maíz es la única que presenta un elevado nivel de domesticación, lo cual quiere decir que es una especie totalmente dependiente de la actividad del ser humano, pues los procesos de selección y mejoramiento genético eliminaron por completo las características ancestrales de sobrevivencia en la naturaleza (Paterniani, 2000).

El maíz es un alimento básico para muchas poblaciones en el mundo, especialmente en México, América Central, Venezuela y Colombia (Cartay, 2000). En nuestro país, esta especie es empleada mayormente para la obtención de la harina precocida, de la cual se elaboran las “arepas”, consideradas como un plato típico nacional. Por ello, la producción de este rubro en Venezuela debería cubrir al menos la necesidad básica nacional establecida por la demanda de la población.

Como es bien sabido, todo sistema de producción agrícola debe contar con un adecuado suministro de semillas, pues de ella depende una buena producción (Oropeza *et al.*, 2000). Para el año 1988, el país se abastecía de la semilla híbrida nacional que iba a emplearse en sus campos de producción; sin embargo, a partir de esa fecha se inició un proceso de desequilibrio en el abastecimiento de este insumo, lo cual trajo como consecuencia, desde el año 2005, la importación de la mayor parte de la semilla híbrida de maíz que se cultiva en los campos venezolanos.

El conocimiento de la agronomía y otras ciencias relacionadas, logró desarrollar procesos y productos capaces de aumentar la eficiencia en la producción de alimentos. Es así como la biotecnología moderna ha acelerado los procesos en el mejoramiento genético de especies vegetales, permitiendo la inserción de genes entre especies evolutivamente distintas y generando nuevos materiales que mediante las técnicas de mejoramiento genético tradicional no hubiese sido posible. En maíz, se han utilizado las técnicas de

infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Ishida *et al.*, 1996), bombardeo de partículas (Klein *et al.*, 1989), corrientes eléctricas de bajo voltaje (Murry *et al.*, 1989) y electroporación (Huang y Dennis, 1989), entre otras. Tales modificaciones siempre han estado centradas en la obtención de plantas con características que van desde la resistencia a herbicidas, plagas y enfermedades hasta aquellas relacionadas con mayor calidad nutricional o mejor calidad alimentaria (Lentini, 2000). El primer maíz transgénico fue desarrollado por Gordon-Kamm *et al.* (1990), el cual era resistente a herbicida. Posteriormente, se han ido agregando otros rasgos y características a este cultivo, y con ello ha ido aumentado la aceptación por parte de los productores agrícolas, no solo de maíz sino de otros cultivos como soya, alfalfa, remolacha azucarera y lechosa, entre otros (James, 2013).

En Venezuela, según la Ley de Tierras y Desarrollo Agrario (2001), la Ley de Semillas y Material para la Reproducción Animal e Insumos Biológicos (2002), la Ley Orgánica de Seguridad y Soberanía Agroalimentaria (2008), el Acuerdo con Motivo del Día Internacional de la Diversidad Biológica (2008) y de la Ley de Gestión de la Diversidad Biológica (2008) no está permitido el uso de OVM, por lo que se debe determinar que los híbridos y cultivares que ingresan al país con fines de investigación o para uso comercial, no sean OVM.

Por las consideraciones expuestas anteriormente, con este trabajo se planteó evaluar por primera vez en Venezuela la presencia de organismos vivos modificados (OVM) susceptibles de ser introducidos en el ambiente, empleando como blancos de detección semillas comerciales de maíz, aplicando métodos moleculares basados en proteínas y ADN.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección y obtención de las semillas objeto de estudio

Para la selección de los materiales comerciales de maíz, se empleó la lista de cultivares elegibles del Servicio

Nacional de Semillas (Senasem), del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras, para el período de siembra 2010-2011 en Venezuela, las cuales representaron al 70% de los cultivares sembrados en las zonas productoras de maíz (Cuadro 1). Como una forma de aplicación de la norma bioética venezolana no se revelan los nombres de los cultivares comerciales evaluados en esta investigación (Briceño *et al.*, 2003).

Las muestras del control negativo, así como los materiales comerciales 1, 2 y 3 se obtuvieron de la Unidad de Producción Socialista de Semillas- INIA, en Maracay, estado Aragua, las cuales se produjeron en Venezuela. Las muestras comerciales de la 4 a la 9 y la 12 fueron obtenidas en una empresa gubernamental y fueron importadas. Las muestras 10 y 11 se obtuvieron de una empresa productora de semillas privada, de carácter nacional. Las muestras categoría "común" son semillas empleadas por pequeños productores y fueron donadas por la Unidad de Recursos Fitogenéticos (URF) del INIA. Para el muestreo, se aplicó un procedimiento propuesto por la Asociación Internacional de Pruebas en Semillas (ISTA, 2003), para lo cual se procedió a la selección aleatoria de los sacos, los cuales se encontraban debidamente sellados y etiquetados con su respectiva identificación (ISTA, 2003; ISO, 2006a), organizados sobre estibas. Se

muestrearon de cinco a seis sacos por cultivar comercial y por estiba, los cuales fueron seleccionados en forma de zigzag. En cada uno de ellos se introdujo un calador, previamente limpio de restos de granos/semillas de otras especies y de otros lotes de maíz muestreados, con el orificio hacia abajo, por una de las esquinas. Se trató, en todos los casos, de alcanzar la otra esquina del saco, en forma diagonal, y en dirección ascendente formando un ángulo aproximado de 30°. Posteriormente, se giró lentamente hasta presentar los orificios hacia arriba y se golpeó suavemente para facilitar la entrada de las semillas. Finalmente, se extrajo el calador, teniendo la precaución de evitar derramar la muestra. Cada vez que el calador era introducido, se extraían muestras de 500 a 600 g por saco, con las cuales se conformaron lotes de semillas de 3 kg aproximadamente que se empacaron en bolsas de papel con su debida identificación. Los orificios abiertos con el calador fueron sellados con ayuda de una etiqueta.

Las semillas muestreadas se trasladaron al Laboratorio de Detección y Cuantificación de Organismos Modificados Genéticamente (OMG), adscrito a la Dirección de Agricultura y Soberanía Alimentaria del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), en donde se inició la aplicación de los métodos de detección molecular de transgénicos. La confirmación del evento específico de transformación

**Cuadro 1.** Cultivares elegibles de maíz de mayor comercialización en Venezuela (2009/2010).

| Categoría de clasificación en el laboratorio | Tipo     | Color del grano | Origen    | Año de liberación |
|--|----------|-----------------|-----------|-------------------|
| Control negativo                             | Variedad | Amarillo        | Venezuela | 1980              |
| Control positivo                             | Híbrido  | Amarillo        | Argentina | 1996              |
| Muestra comercial 1                          | Variedad | Amarillo        | Venezuela | 2009              |
| Muestra comercial 2                          | Variedad | Amarillo        | Venezuela | 2009              |
| Muestra comercial 3                          | Variedad | Blanco          | Venezuela | 2005              |
| Muestra comercial 4                          | Híbrido  | Blanco          | México    | 2003              |
| Muestra comercial 5                          | Híbrido  | Amarillo        | Tailandia | 2001              |
| Muestra comercial 6                          | Híbrido  | Blanco          | México    | 2008              |
| Muestra comercial 7                          | Híbrido  | Blanco          | México    | 2011              |
| Muestra comercial 8                          | Híbrido  | Amarillo        | México    | 2005              |
| Muestra comercial 9                          | Híbrido  | Amarillo        | EEUU      | 1999              |
| Muestra comercial 10                         | Híbrido  | Blanco          | Venezuela | 2005              |
| Muestra comercial 11                         | Híbrido  | Blanco          | Venezuela | 2005              |
| Muestra comercial 12                         | Híbrido  | Blanco          | México    | 2006              |
| Muestra común 1                              | Variedad | Blanco          | URF-INIA  | No determinado    |
| Muestra común 2                              | Variedad | Amarillo        | URF-INIA  | No determinado    |

transgénica, se realizó en el Laboratorio de Detección de OMG, del Centro de Investigaciones Veterinarias y Agronómicas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina, para lo cual se solicitaron los respectivos permisos en Venezuela, con el fin de transportar las muestras de ADN fuera del país.

### **Preparación de las muestras de laboratorio**

Para la preparación de las muestras de laboratorio, se contó con un molinillo eléctrico comercial de café, marca Moulinex®, cuya capacidad del recipiente de molienda es de 300 g. La labor se inició con la limpieza del molinillo con un paño humedecido con una solución de etanol al 70% (tres veces), y una vez con hipoclorito de sodio al 3,5%. Este protocolo de limpieza se realizó entre muestras y al finalizar la molienda, tal y como lo sugieren Di Bernardo *et al.*, (2007).

La molienda se realizó por tandas en función de la capacidad del molinillo, iniciándose con el control negativo, para posteriormente moler las muestras problema. En cada tanda se colectó, en un vaso plástico descartable, el polvo que quedaba adherido a las paredes del equipo y fue removido con ayuda de una espátula esterilizada, se homogeneizó y se almacenó en un tubo de 50 mL esterilizado. De ahí se separaron cinco muestras de laboratorio, dos sub-muestras con 5 g de harina de maíz se colocaron en vasos plásticos descartables con el fin de realizar los inmunoensayos de evaluación directa, dos fueron colocadas en dos viales de 1,5 mL, llenando los mismos hasta la marca de 100  $\mu$ L, con las cuales se realizaron las pruebas de detección de transgénesis basadas en ADN. Un vial totalmente lleno se constituyó en la muestra de existencia de laboratorio, la cual se almacenó a 4°C.

### **Aplicación de las tiras de flujo lateral**

En este ensayo se utilizaron las tiras de flujo lateral (Trait®) desarrolladas por la empresa Strategic Diagnostics Inc. (SDI, EUA), con el fin de evaluar las siguientes proteínas transgénicas: Cry1Ab, Cry3Bb, y CP4 EPSPS, las cuales detectan en grupo los rasgos asociados con resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida Round up Ready®. Las muestras de análisis para esta metodología se obtuvieron agregando a las muestras de laboratorio, 7 mL de agua destilada estéril, agitando vigorosamente hasta obtener una mezcla. Adicionalmente, se realizó una prueba, la cual consistió en germinar 50 semillas de cada cultivar en bandejas de plástico con papel de filtro común, regadas diariamente con

agua durante una semana, bajo extremas condiciones de seguridad biológica. Luego todas las plantas germinadas fueron maceradas vigorosamente, eliminando los restos de papel, en morteros fríos hasta obtener la mayor cantidad de zumo de las plántulas.

En cada mezcla se introdujo una tira de flujo lateral, se esperó a que fluyera el líquido por la tira hasta observar que la banda control se coloreara. Luego se extrajo de la mezcla, dejando secar en papel secante y finalmente se comparó con el patrón de referencia que posee el kit. La aparición de una línea (control) indica que la prueba se desarrolló de manera adecuada, y que el cultivar puede considerarse negativo para los eventos antes mencionados, mientras que la aparición de una o dos bandas, adicionales a las del control, indica un resultado positivo (Chen Lin *et al.*, 2001; Quirasco *et al.*, 2004).

### **Pruebas de detección basadas en ADN**

Todas las pruebas de detección basadas en ADN se realizaron por duplicado, empleando métodos no normalizados por la ISO (ISO, 2005a). Las pruebas se realizaron en dos repeticiones con el fin de evaluar la reproducibilidad de los ensayos de laboratorio. En todas las pruebas de este tipo, se utilizó un control negativo del transgen, que se corresponde con un cultivar de maíz producido por mejoramiento genético tradicional en Venezuela, un control negativo de PCR (reemplazando el ADN molde por agua), un control negativo de la especie específica (ADN de soya) para el caso del gen endógeno de la invertasa y un control positivo del transgénico, el cual provino de un ADN extraído a partir de una harina de maíz que poseía el Laboratorio del IDEA, donada por el Laboratorio de Detección de OMG del INTA de Argentina.

### **Extracción y cuantificación del ADN**

La extracción del ADN de las muestras se realizó mediante el uso del kit comercial Nucleospin (Macherey Nagel, Alemania). Una vez realizado el proceso de extracción, se comprobó la cantidad y calidad del ADN según lo descrito por Tengal *et al.* (2001).

### **Aplicación de la PCR convencional para la amplificación del gen de la invertasa de maíz y la detección primaria de P35S, Tnos, Pat y Bar**

Se aplicó una prueba de detección para amplificar por PCR convencional, un fragmento de ADN asociado con el gen de copia única de la invertasa de maíz, con el fin de evaluar la calidad del ADN extraído y la presencia

de inhibidores. Luego se estudió las secuencias de varios eventos de transformación transgénica, evaluando aquellas relacionadas con el P35S del virus del mosaico de la coliflor y del Tnos de *Agrobacterium tumefaciens*, por PCR en tiempo final (Cuadro 2). Las condiciones de reacción de la PCR y los programas del termociclador se variaron de acuerdo con el blanco de detección de interés (Cuadros 3 y 4). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2,5% (m/v), preparados con búfer TBE al 1%, pH 8,3, se observaron y fotografiaron en un sistema de fotodocumentación GelDoc (BioRad®).

La evaluación de las secuencias de los genes de la fosfinotricina acetiltransferasa aislados de *Streptomyces viridochromogenes* (Pat) y de *S. hygrosopicus* (Bar) se realizó por PCR en tiempo real, en el INTA Argentina utilizando los cebadores indicados en el Cuadro 2. Se usó el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics®). Las condiciones del programa de PCR fueron las sugeridas por el manual de procedimientos del kit antes mencionado. Se reportaron como detectadas aquellas muestras que presentaron un temperatura de Melting en el rango esperado para el producto de amplificación y con un valor de Ct < a (Ct del control +2) de acuerdo a lo sugerido por Hernández *et al.* (2003) y Corbisier *et al.* (2005).

#### Detección de los eventos T25, Bt-11 y TC1507 por PCR en tiempo real

Para identificar los eventos específicos de transformación T25, Bt-11 y TC1507 se procedió a

realizar las respectivas PCR en tiempo real, según lo descrito, sólo en aquellas muestras que se detectaron para P35S, Tnos, Pat y/o Bar, utilizando las secuencias de los cebadores que se indican en el Cuadro 5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Tiras de flujo lateral

En la Figura 1 se observa que todas las tiras se colorearon a nivel del control de detección, es decir, que la prueba se aplicó de manera correcta. También puede observarse que cuando se aplicaron las tiras directamente sobre la harina de semillas de maíz, ninguno de los cultivares de maíz resultó detectado para los eventos de transformación que se estaban evaluando (Figura 1a). En contraste, cuando se aplicó la prueba en semillas germinadas por una semana, se logró observar que el cultivar comercial 12 fue detectado para la característica resistencia a insectos lepidópteros, pues se coloreó la tira a nivel de la proteína Cry1Ab (Figura 1b). El resultado falso negativo se debió en buena parte a que las semillas son sometidas a temperaturas que superan los 50°C, con el fin de disminuir la humedad de campo a la humedad apropiada de comercialización (AOSA, 1985), por lo que en este tipo de fracción de análisis, la proteína transgénica es desnaturalizada y no es reconocida en su sitio en la banda. Cuando este tipo de ensayos es realizado en granos, si es posible la detección de la proteína transgénica, por lo que se recomienda usar la misma en aduanas para la detección temprana de OVM (Lipp *et al.*, 2000; Van Duijn *et al.*, 2002).

**Cuadro 2.** Cebadores empleados para evaluar las secuencias asociadas con el gen endógeno de maíz y las secuencias asociadas con el P35S, Tnos, Pat y Bar.

| Blanco   | Cebador | Secuencia 5' → 3'         | TA <sup>1</sup> | TPA <sup>2</sup> | Referencia                      |
|----------|---------|---------------------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| Endógeno | Ivr-1   | CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC | 60              | 226              | Ehlers <i>et al.</i> (1997)     |
|          | Ivr-2   | GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC |                 |                  |                                 |
| P35S     | P35S-U  | GCTCCTACAAATGCCATCAGATAGT | 58              | 195              | Lipp <i>et al.</i> (1999)       |
|          | P35S-L  | GATAGTGGGATTGTG CGTCA     |                 |                  |                                 |
| Tnos     | NOS-A   | GAATCCTGTTGCCGGTCTTGCG    | 63              | 127              | Thion <i>et al.</i> (2002)      |
|          | NOS-D   | GCGGGACTCTAATCATAAAAACCC  |                 |                  |                                 |
| Pat      | PatF2   | GAAGGCTAGGAACGCTTACG      | 62              | 262              | Permingeat <i>et al.</i> (2002) |
|          | PatR2   | GCCAAAACCAACATCATGC       |                 |                  |                                 |
| Bar      | BarF2   | GCACAGGGCTTCAAGAGCGTGGTC  | 62              | 177              | James <i>et al.</i> (2003)      |
|          | BarR2   | GGGCGGTACCGGCAGGCTGAA     |                 |                  |                                 |

<sup>1</sup> TA: Temperatura de alineamiento (en °C).

<sup>2</sup> TPA: Tamaño del producto amplificado (en pares de bases).



**Cuadro 3.** Condiciones de reacción de la PCR en tiempo final según el blanco de detección. Volumen final: 25  $\mu$ L.

| Componente       | Blanco de detección |               |      |
|------------------|---------------------|---------------|------|
|                  | Endógeno            | P35S          | Tnos |
| Búfer            |                     | 1X            |      |
| MgCl, mM         | 4                   | 4             | 1,25 |
| Cebador, $\mu$ M | 0,2                 | 0,5           | 0,5  |
| dNTP, $\mu$ M    |                     | 0,2           |      |
| Taq, U           |                     | 0,625         |      |
| DMSO, %          |                     | 5             |      |
| ADN, $\eta$ g    |                     | $\approx$ 200 |      |

**Cuadro 4.** Programas de la PCR en tiempo final según el blanco de detección.

| Ciclo                     | Temperatura         | Tiempo |
|---------------------------|---------------------|--------|
|                           | $^{\circ}$ C        | min    |
| Desnaturalización inicial | 95                  | 3      |
| Desnaturalización         | 95                  | 0,75   |
| Alineamiento              | 58 Ivr <sup>1</sup> | 0,75   |
|                           | 60 P35S             |        |
| Amplificación             | 63 Tnos             | 0,5    |
|                           | 72                  |        |
| Amplificación final       | 72                  | 5      |

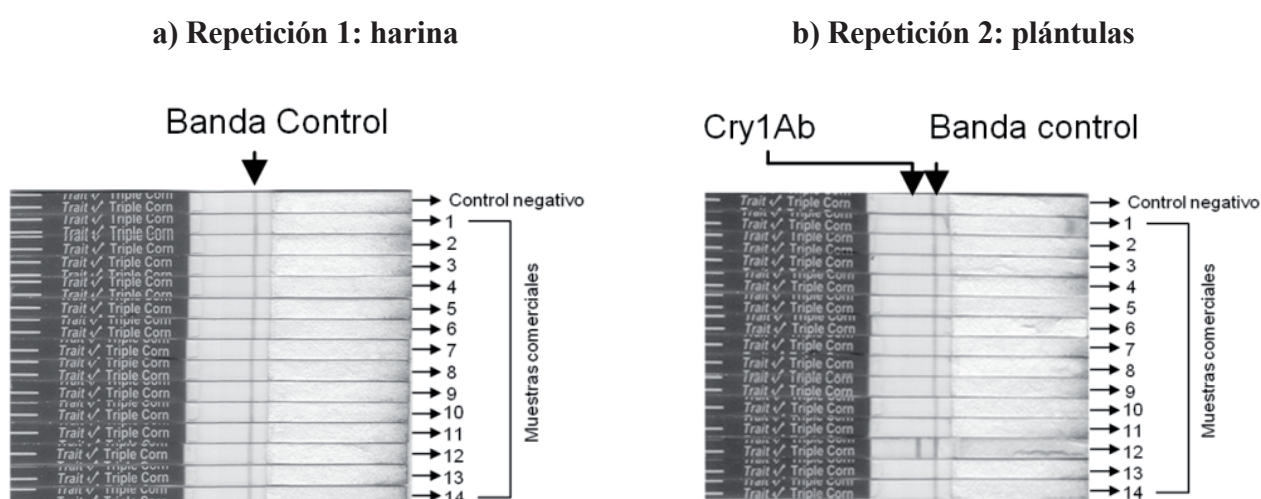
<sup>1</sup> Ivr: endógeno, P35S: promotor 35s, Tnos: Terminador NOS.

**Cuadro 5.** Promotores empleados para evaluar las secuencias asociadas con los eventos T25, Bt-11 y TC1507.

| Blanco | Promotor | Secuencia 5' $\rightarrow$ 3' | TA <sup>1</sup> | TPA <sup>2</sup> | Referencia                      |
|--------|----------|-------------------------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| T25    | T25-1F   | CAGCGACAATGGCGGAACGACTCAA     | 65              | 225              | CRL (2008)                      |
|        | T25-2R   | CCTTTCCTTTATCGCAATGATGGCA     |                 |                  |                                 |
| Bt-11  | Bt11-1   | TATCATCGACTTCCATGACCA         | 63              | 207              | Zimmermann <i>et al.</i> (2000) |
|        | Bt11-2   | AGCCAGTTACCTTCGGA AAA         |                 |                  |                                 |
| TC1507 | MaiY-F1  | TAGTCTTCGGCCAGAATGG           | 60              | 58               | CRL (2005)                      |
|        | MaiY-R3  | CTTTGCCAAGATCAAGCG            |                 |                  |                                 |

<sup>1</sup> TA: Temperatura de alineamiento (en  $^{\circ}$ C).

<sup>2</sup> TPA: Tamaño del producto amplificado (en pares de bases).

**Figura 1.** Resultados de la aplicación de las tiras de flujo lateral en muestras comerciales de maíz. a) en semillas; b) en plántulas.

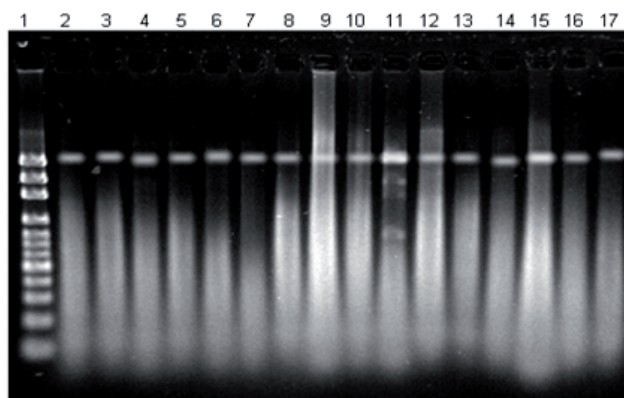
El uso de las tiras de flujo lateral es recomendable debido a su facilidad de realización, rapidez en la obtención de resultados, reproducibilidad y repetitividad (Stave, 2002); sin embargo tienen como desventaja que sólo puede utilizarse en muestras con un mínimo, o ningún procesamiento previo, pues es la única forma de garantizar que los resultados de la aplicación del método expresen los niveles de sensibilidad adecuados (Longo y Galindo, 2006; Rochedo *et al.*, 2006), tal y como se obtuvo en este estudio.

### Extracción de ADN de las muestras de maíz

El método de extracción de ADN utilizado fue adecuado, pues se desarrolló específicamente para extraer ADN en matrices poco procesadas, así como en productos alimenticios con bajo contenido de lípidos y que no han recibido intensos tratamientos térmicos (Cazzola y Petrucci, 2006). De esta manera, debido al poco procesamiento de las muestras se recomienda utilizar el kit comercial desarrollado por Macherey Nagel, ya que así se estandarizan las condiciones entre laboratorios en cuanto a la extracción de ADN (Thion *et al.*, 2002; ISO, 2005b; Di Bernardo *et al.*, 2007) como se muestra en la Figura 2.

### Evaluación del gen endógeno

Mediante esta estrategia se logró amplificar de manera específica y adecuada el gen endógeno de referencia asociado con la invertasa de maíz, tal y como



**Figura 2.** Análisis de la extracción de ADN de las muestras de soya objeto de estudio, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles: 1: Marcador de ADN 1kb plus (Invitrogen), 2: Control negativo: maíz nacional, 3: Control positivo: Harina de maíz modificado genéticamente, 4 al 15: Muestras comerciales 1 al 12. 16 y 17: Muestras comunes 1 y 2.

se esperaba sólo en las muestras de maíz y no en los controles de reacción de la PCR, las cuales fueron muestras contentivas de agua y ADN de soya (James *et al.*, 2003; Cazzola y Petrucci, 2006); también se estableció que los reactivos de PCR funcionaron de manera adecuada (Figura 3). Resultados similares fueron obtenidos por Quirasco *et al.* (2004) al evaluar tortillas mexicanas de maíz elaboradas de diferentes formas, donde los mejores resultados de la evaluación del gen endógeno se obtuvo en las tortillas preparadas con granos de maíz con poco procesamiento, tal y como se obtuvo en esta investigación.

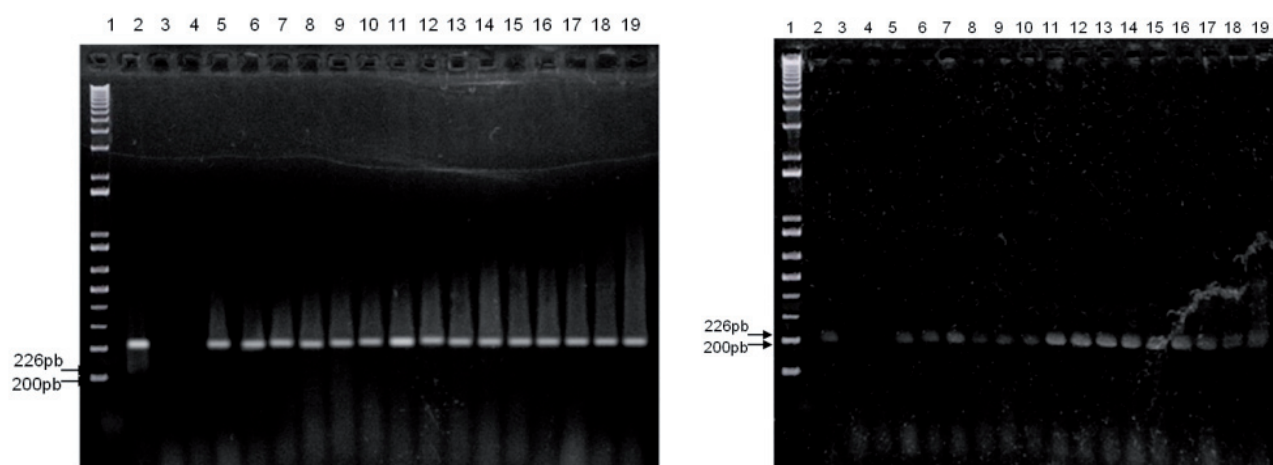
Por otra parte se puede asegurar que el procedimiento de extracción permitió obtener un ADN de longitud, pureza e integridad estructural suficiente para ser amplificado por PCR (Tengel *et al.*, 2001). Se concluye que tanto la extracción de ADN, así como la PCR para evaluar la identidad del maíz, se realizó de forma correcta ya que los resultados obtenidos de manera independiente son similares entre sí, lo cual le da el carácter de reproducibilidad al ensayo (ISO, 2005c). Resultados similares fueron observados por Cazzola y Petrucci (2006).

### Aplicación de la estrategia general primaria

#### Evaluación de la presencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y del Terminador NOS de *A. tumefaciens*

Los resultados de la Figura 4 (a y b) indican que la muestra comercial 12 presentó la banda esperada de 195 pb (línea 16), la cual está asociada con la existencia del P35S, pudiendo encontrarse inserto desde una copia hasta un número variable de copias en el genoma de la planta de maíz (Hemmer, 1997; Pietsch *et al.*, 1997; Zhang y Guo, 2011). Por su parte, con respecto al Tnos de *A. tumefaciens*, los resultados indican que la muestra comercial 12 (línea 16) contenía ADN amplificable de una fuente similar o igual al Tnos, generando una banda en el tamaño esperado y similar al producto del control positivo de amplificación (Figura 4 c y b).

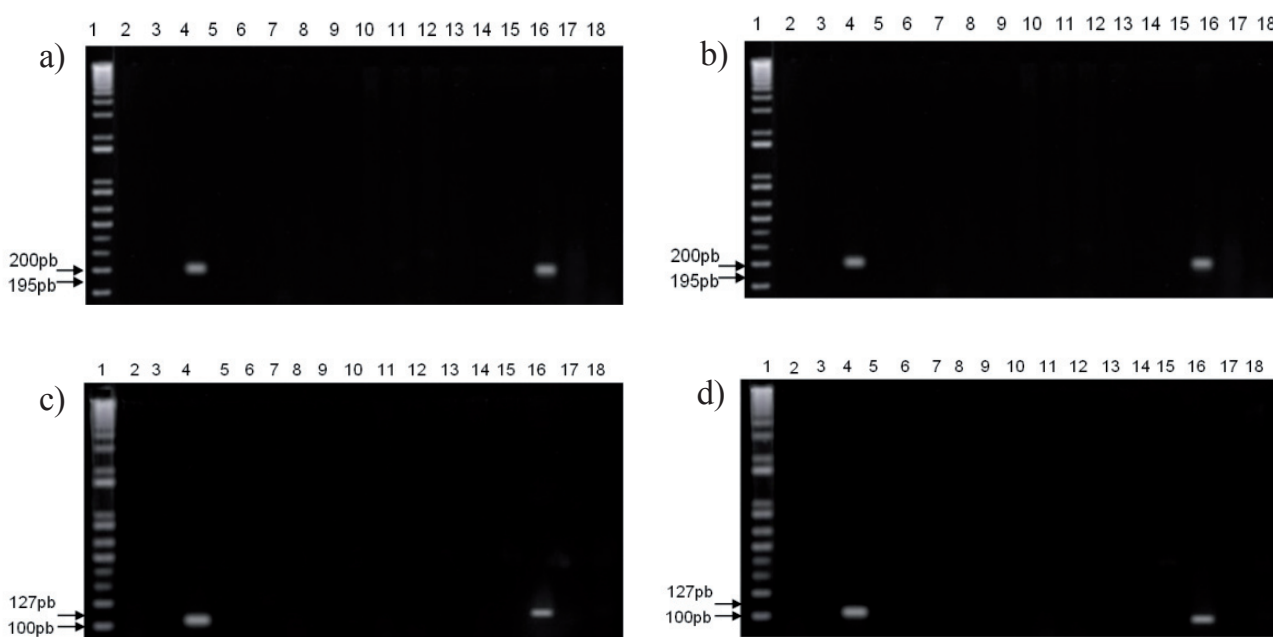
En la actualidad la mayoría de los cultivos transgénicos comercializados contienen las secuencias de estas señales de inicio y fin de la expresión del transgen, motivo por el cual es frecuentemente utilizado en ingeniería genética para lograr tal fin (Hemmer, 1997; Pietsch *et al.*, 1997). El P35S se encuentra comunmente en los siguientes eventos de transformación de maíz: Bt-



**Figura 3.** Amplificación del gen de la invertasa en muestras comerciales de semillas de maíz. Carriles: 1: Marcador de ADN 1kb plus (Invitrogen), 2: Control negativo de transgénico, 3: Control negativo de reacción, 4: Control negativo de endógeno, 5: Control positivo de transgénico, 6 al 17: Muestras comerciales 1 a la 12, 18 y 19: Muestras comunes 1 y 2.

176, Bt-11, MON810, TC1507, DAS59122, T25, MON88017, MON863 y NK603, siendo detectable a límites de 0,1% en granos de maíz, empleando como materiales de referencia aquellos que han sido certificados por la Joint Research Center (ISO, 2006b). El Tnos puede detectarse en los siguientes eventos:

Bt11, TC1507, MON88017, MON863, NK603 y GA21 a límites de 2%. Finalmente se resalta que sólo los eventos Bt 11, TC1507, MON88017, MON 863 y NK603 son los que tienen en la misma construcción transgénica a ambos reguladores de la expresión del transgen en maíz (Zhang y Guo, 2011).



**Figura 4.** Productos de amplificación del P35S (a y b) y del TNOS (c y d) en muestras comerciales de semillas de maíz. Carriles: 1: Marcador de ADN 1kb plus (Invitrogen), 2: Control negativo de transgénico, 3: Control negativo de reacción, 4: Control positivo de transgénico, 5 al 16: Muestras comerciales 1 al 12, 17 y Muestras comunes: 1 y 2.



### Evaluación de la presencia de los genes Pat y Bar

Mediante la aplicación de la PCR en tiempo real se logró detectar la proteína Pat, con valores de Ct de 22,04 y 22,26 ( $\Delta Ct < 0,5$ ) coincidiendo con lo reportado por la CRL (2005) de la Unión Europea, con diluciones del ADN de la muestra de 1:1. Por otra parte, se señala que la proteína Bar no fue detectada.

En el entendido de que ninguna de las pruebas antes aplicadas es concluyente para indicar si un cultivar es o no transgénico, se procedió a aplicar una prueba adicional con el fin de confirmar el origen transgénico de la muestra 12 y la identificación exacta de la secuencia modificada genéticamente. Previo a la aplicación de la prueba, se hizo una búsqueda en los portales de Shanghai GMO platform ([www.shgmo.org](http://www.shgmo.org)), del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio de Diversidad Biológica ([www.bch.cdb.int](http://www.bch.cdb.int)), así como en el Center for Environmental Risk Assessment ([www.cera-gmo.org](http://www.cera-gmo.org)), tomando como criterios que la muestra comercial 12 fue detectada para P35S, Tnos y Pat. De tal búsqueda se desprende que los eventos Bt-11, T25 y TC1507 tienen una mezcla de estos promotores y terminadores; de ellos, el único que cumple perfectamente con la existencia de los tres elementos es el evento TC1507, registrado con el identificador único de la OECD (2006) como DAS-Ø15Ø7-1, el cual fue registrado por las empresas Pioneer Hi-Breed International y Mycogen Seed. Sin embargo, se hizo la prueba empleando los cebadores también para los eventos Bt-11 y T25, con el fin de descartar que posiblemente hubiese algunos de estos dos eventos de transformación.

### Identificación del evento específico TC1507

Se pudo confirmar mediante PCR en tiempo real, que la muestra comercial 12 es un cultivar de maíz que contiene el evento de transformación DAS-Ø15Ø7-1, asociado a la resistencia a herbicidas y tolerancia a insectos lepidópteros. Dicho evento fue desarrollado en la línea de maíz 1507 y transformado mediante el uso de la tecnología de aceleración de partículas empleando el fragmento de ADN PHI8999A, que presenta dos cassetes de modificación. El primero presenta una versión truncada de Cry1F derivada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* que le confiere resistencia a los insectos plaga *Ostrinia nubilis*, *Spodoptera frugiperda*, *Agrotis* sp. y *Diatraea* sp., bajo la regulación del promotor ubi-

quitín ubiZM1(2) derivado de maíz y del terminador ORF25polyA de *A. tumefaciens* pTi5955. El segundo posee una versión sintética de Pat derivado de *S. viridochromogenes* que le confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, bajo la regulación del P35S, que actúa como promotor y terminador de esta secuencia modificada genéticamente (CEC, 2005).

Dicho evento de transformación ha sido aprobado en EEUU (Shanahan, 2000), Canadá (CFIA, 2002), Argentina (MPAG, 2005), Colombia (Invima, 2006), Europa (CEC, 2005) y Brasil (CTNBio, 2008). Como se observa, dicho cultivar está aprobado en todos los países de la región y en la Unión Europea, quizás por el hecho de presentar conjuntamente dos características agronómicas importantes para los agricultores, además de no tener mayores inconvenientes desde el punto de vista ambiental (Dubelman, *et al.*, 2005; Buntin, 2008), nutricionales y de salud (Mackenzie *et al.*, 2006).

Según los resultados derivados en esta investigación, se obtuvo que de doce materiales comerciales de maíz evaluados, uno es un OVM, lo que quiere decir que en Venezuela ya se están comercializando semillas de OVM. También resulta interesante citar que el evento DAS-Ø15Ø7-1 proviene de líneas o híbridos de color amarillo, resultado que no concuerda con la muestra obtenida en esta investigación, en donde la muestra es de color blanco. Esto puede explicarse por el consumo preferencial del maíz blanco como harina precocida, materia prima para la elaboración de las arepas. Es conocido que en Colombia esta línea de maíz si es de color blanco, y que en la vecina república también es común el consumo de arepas (Cartay, 2000).

Dicho cultivar fue comprado y distribuido por el gobierno nacional mediante una empresa agrícola gubernamental que adquirió dicho material a finales del año 2010. Venezuela ha suscrito diferentes convenios de cooperación agrícola con países donde está aprobado el uso de este evento de transformación. También se resalta el hecho innegable de que en la práctica el país no aplica ningún tipo de pruebas para conocer el estatus de modificación genética del material sujeto de introducción al país, siendo de particular importancia para el Estado Venezolano la ejecución de esta labor.

También resulta interesante resaltar que muchos eventos apilados poseen este evento transgénico, entre los cuales se pueden mencionar DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ6Ø3, DAS-Ø15Ø7-1 x DAS-59122-7 y

DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ6Ø3 x DAS-59122-7, entre otros, motivo por el cual no solo podría hablarse del evento DAS-Ø15Ø7-1, sino de cualquiera de estas combinaciones que podrían estar expendiéndose en casas comercializadoras de semillas de Venezuela.

### CONCLUSIONES

Se considera que las tiras de flujo lateral no son un método de detección recomendable de aplicar a las semillas, dado que el procesamiento térmico para disminuir la humedad de las mismas compromete la estructura de la proteína transgénica y por tanto no es reconocida de manera específica en el sitio de la banda diseñado para ello. Sin embargo, cuando no se dispone de otro método, pero sí de tiempo, se pueden hacer germinar las semillas y realizar este tipo de pruebas, dado que se activa la maquinaria celular, se inicia la producción de proteínas en las plántulas y allí si son detectadas las proteínas modificada genéticamente.

De la aplicación de la estrategia de detección primaria, se logró la detección del P35S, Tnos y Pat en una de las muestras comerciales, lo que condujo a la detección del evento de transformación DAS-Ø15Ø7-1 asociado con la resistencia a herbicida y tolerancia a insectos lepidópteros.

Con esta investigación se establece por primera vez el uso de OVM en semillas comerciales de maíz en Venezuela, por lo que se sugiere a las autoridades respectivas sincerar la situación nacional, mediante la aplicación de las leyes en la materia o actualizando la posición nacional en cuanto al uso de las nuevas tecnología en la agricultura.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuerdo con Motivo del Día Internacional de la Diversidad Biológica. 2008. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. N° 38.942. 30 mayo 2008. Caracas, Venezuela.
- AOSA (Association of Official Seed Analysis). 1985. Rules for testing seeds. J. Seed Technol. 6: 111-114.
- Bejarano, A.; V. Segovia. 2000. Origen del maíz. In Fontana, H.; C. González (Eds) El maíz en Venezuela. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. Caracas; Venezuela. pp. 11-14.
- Briceño, E; E. de Suarez; C. Michelangeli; D. Feliciangeli; E. Otaiza; J. Mendible; M. Villalon; M. Aguilera; H. Ceballos; J. Godoy; C. Camilloni. 2003. Código de Bioética y Bioseguridad. 2<sup>da</sup> ed. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia; Tecnología e Industrias Intermedias. Caracas, Venezuela. 134 p.
- Buntin, D. 2008. Corn expressing Cry1ab or Cry1f endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidopteran: Noctuidae) management in field corn for grain production. Flo. Entomol. 91: 523-530.
- Cartay, R. 2000. El consumo de maíz en Venezuela. In El maíz en Venezuela. Fontana, H.; C. González (Eds) Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. pp. 238-254.
- Cazzola, M.; S. Petruccelli. 2006. Semiquantitative analysis of genetically modified maize and soybean in food. Elec. J. Biotech. 9: 320 – 325.
- CEC (Commission of the European Communities). 2005. Commission Decision 2005/772/EC. Off. J. Eur. Uni. 291: 42-44.
- CFIA (Canadian Food Inspection Agency). 2002. Decision document DD2002-41. Determination of the safety of Dow AgroSciences Canada Inc. and Pioneer Hi-Bred International's insect resistant and glufosinate - ammonium tolerant corn (*Zea mays* L.) Line 1507. Canadian Food Inspection Agency Plant Products Division. Ontario, Canadá. 14p.
- Chen Lin, R.; Z. Song; L. Bi; T. Yun-Kuang. 2001. A rapid and efficient DNA minipreparation suitable for screening transgenic plant. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 379a-379e.
- Corbisier, P.; S. Trapmann; D. Gancberg; L. Hannes; P. Iwaarden; G. Berben; H. Schimmel; H. Emons. 2005. Quantitative determination of Roundup Ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. Anal. Bioanal. Chem. 383: 282-290.
- CRL (Community Reference Laboratory). 2005. Event-specific method for the quantification of maize line TC1507 using real-time PCR. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. Roma, Italia. 10 p.

- CRL. 2008. Event-specific method for the quantification of maize line Bt11 using real-time PCR. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. Roma, Italia. 10 p.
- CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). 2008. Parecer Técnico N° 1679. Liberação comercial de milho geneticamente modificado. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Brasília; Brasil. 27 p.
- Di Bernardo, G.; S. Del Gaudio; U. Galderisi; A. Cascino; M. Cipollaro. 2007. Evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biotech. Prog.* 23: 297-301.
- Dubelman, S.; B. Bonnie; C. Bader; C. Brown y D. Vlachos. 2005. Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use. *Environ. Entomol.* 34: 915-921
- Ehlers, V., S. Goltz; D. Kubsch; H. Wagner; H. Maidhof; J. Bendiek; B. Appel; H. Buhk. 1997. Nachweis gentechnischer veränderungen in mais mittels PCR. *Bundesgesundhbl.* 4/97: 118-121.
- Gordon-Kamm, W., T. Spencer; M. Mangano; T. Adams; R. Daines; W. Start; J. O'brien; S. Chamber; W. Adams; N. Willetts; T. Brice; C. Mackey; R. Krueger. A. Kausch; P. Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
- Hemmer, W. 1997. Foods derived from genetically modified and detection methods. BATS report. Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology. Swiss National Science Foundation. Basel, Suiza. 2/97. pp. 40-44.
- Hernández, M.; D. Rodríguez; T. Esteve; S. Prat; M. Pla. 2003. Development of melting temperature-based SYBR green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *J. Anal. Biochem.* 323: 164-170.
- Huang, Y.; E. Dennis. 1989. Factors influencing stable transformation of maize protoplasts by electroporation. *Plant Cell Tissue Cult.* 18: 281-296.
- Ishida, Y.; H. Saito; S. Otha; Y. Hei; T. Komari; T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.* 14: 745-750.
- ISTA (International Seed Testing Analysis). 2003. Proceeding 16th annual symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty. Supplement to volume 1. San Francisco, EUA. 95 p.
- ISO. 2005a. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos. Norma 21570. Génova, Suiza.
- ISO. 2005b. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos. Norma 21571. Génova, Suiza.
- ISO. 2005c. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Requisitos generales y definiciones. Norma 24276. Génova, Suiza.
- ISO. 2006a. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Toma de muestra. Norma 21568. Génova. Suiza.
- ISO. 2006b. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos. Norma 21569. Génova. Suiza.
- Invima (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos). 2006. Acta 5 del 17 octubre de 2006. Numeral 2 (Maíz DAS-01507-1) de la Sala Especializada de Alimentos y Bebidas Alcohólicas. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Bogotá, Colombia.
- James, C. 2013. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2012. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Manila, Las Filipinas.
- James, D.; A. Smchmidt; E. Wall; M. Green; S. Masri. 2003. Reliable detection and identification of genetically modified maize; soybean and canola by multiplex PCR analysis. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5829 – 5834.

- Klein, T.; L. Kornstein; M. Fromm. 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment and the influence of methylation on foreign gene expression. In: Gustafson J. P (ed.). Gene manipulation in plant improvement. Plenum Press. New York, EUA. pp. 265-288.
- Lentini, Z. 2000. Biotecnología en el fitomejoramiento del maíz. In *El maíz en Venezuela*. Fontana, H.; C. González (Eds) Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. pp. 207 – 234.
- Ley Orgánica de Seguridad y Soberanía Agroalimentaria. 2008. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. N° Extraordinario 5.891. 31 julio 2008. Caracas, Venezuela.
- Ley de Tierras y Desarrollo Agrario. 2001. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. N° 37.323. 13 noviembre 2001. Caracas, Venezuela.
- Ley de Semillas y Material para la Reproducción Animal e Insumos Biológicos. 2002. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. N° 37.552. 18 octubre 2002. Caracas, Venezuela.
- Ley de Gestión de la Diversidad Biológica. 2008. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. N° 39.070. 1 diciembre 2008. Caracas, Venezuela.
- Lipp, M.; E. Anklam; J. Stave. 2000. Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 83: 919-927.
- Longo, F.; I. Galindo. 2006. Métodos de detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en la cadena agroalimentaria: conceptos para su aplicación. Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe y de la Red Regional de Bioseguridad. Caracas, Venezuela. 63 p.
- Mackenzie, S., I. Lamb; J. Schmidt; L. Deege; M. Morrissey; M. Harper; R. Layton; L. Prochaska; C. Sanders; M. Locke; J. Mattsson; A. Fuentes; B. Delaney. 2006. Thirteen week feeding study with transgenic maize grain containing event DAS-Ø15Ø7-1 in Sprague–Dawley rats. *Food Chem. Tox.* 45: 551–562.
- MPAG (Ministerio de Agricultura; Ganadería y Pesca). 2005. Resolución 143 Aprobación del uso del maíz TC1507 para alimentación humana; animal y liberación al ambiente en la República Argentina. Buenos Aires, Argentina.
- Murry, L.; J. Jhonson; S. Nichols. 1989. Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase in electrotransformed corn embryos. *Am. J. Bot.* 77: 151a.
- OECD (Organization for Economic Cooperation Development). 2006. Guidance for the designation of a unique identifier for transgenic plants. Serie No. 23. On harmonization of regulatory oversight in biotechnology. Paris; Francia. 14 p.
- Oropeza, H.; C. Márquez; D. Nuñez. 2000. Tecnología de la producción de semillas. In *El maíz en Venezuela*. Fontana, H.; C. González (Eds) Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. pp. 407 – 438.
- Paterniani, E. 2000. Métodos de mejoramiento genético de poblaciones de maíz. In *El maíz en Venezuela*. Fontana, H.; C. González (Eds) Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. pp. 107 – 138.
- Permingeat, H.; R.M. Reggiardo; R. Vallejos. 2002. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4431-4436.
- Pietsch, K.; H. Waiblinger; P. Broddman; A. Wurz. 1997. Screening method for the detection of genetically modified plants. *Dtsch Lebens Rundsch.* 93: 35-38.
- Quirasco, C.; B. Schoel; J. Plasencia; J. Fagan; A. Galvez. 2004. Suitability of real time quantitative PCR and enzyme linked immunoabsorbent assay for cry9C detection in mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *J. AOAC Int.* 87: 639-646.
- Rochedo, F.; A. Nunes; P. Canisio. 2006. Deteccao e quantificacao de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Ciencia Rural* 36: 315 – 324.
- Shananhan, D. 2000. Documento aprobatorio 00-136-olp. Dossier técnico para la desregulación del evento TC1507 en USA. Dow AgroSciences LLC. Indianapolis, EUA.



- Stave, J. 2002. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations and practical considerations. *J. AOAC Int.* 85: 780-786.
- Tengel, C.; P. Schubler; E. Setze; J. Balles; M. Sprenger. 2001. PCR based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Biotechniques* 31: 426 – 429.
- Thion, L.; C. Vossen; B. Couderc; M. Erard; B. Clemenccon. 2002. Detection of genetically modified organisms in food by DNA extraction and PCR amplification. *J. Biochem. Mol. Biol. Edu.* 30: 51-55.
- Van Duijn, G.; R. van Biert; H. Bleeker-Marcelis; I. Van Boeijen; A. Jama; S. Jhakrie; M. Helsing. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: Bridging the methods. *J. AOAC Int.* 85: 787-791.
- Zhang, D.; J. Guo. 2011. The development and standardization of testing method for genetically modified organisms and their derived product. *J. Integ. Plant Biol.* 53: 539-551.
- Zimmermann, A.; J. Lukthy; U. Pauli. 2000. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm. Wiss. u.-Technol.* 33: 210-216.