

ANÁLISIS DE TRANSGÉNESIS MEDIANTE PCR DE 20 HARINAS DE MAÍZ (POLENTAS) QUE SE ENCUENTRAN A LA VENTA EN EL MERCADO URUGUAYO

Martín Fernández Campos¹, Adriana Da Silva², Claudio Martínez Debat¹.

¹LaTraMA - Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria. Sección Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Iguá 4225. CP 11400. Montevideo, Uruguay. ²Laboratorio de Bromatología, Intendencia Municipal de Montevideo. Isla de Flores 1323. CP 11200. Montevideo, Uruguay. e-mail: clau@fcien.edu.uy

Palabras clave. Harina de maíz. ADN, transgénesis, Bt

RESUMEN

En Uruguay, la liberación de vegetales modificados genéticamente está regulada por el Decreto de Ley No 353/008 (2008). Si bien existen varios eventos transgénicos en trámite de liberación, tanto de soja como de maíz, por el momento sólo los maíces Bt11 y Mon810 y la soja RR son los únicos cultivos genéticamente modificados (GM) liberados al ambiente en nuestro país, que ocupa el 9º lugar en el mundo como productor de cultivos GM. Con respecto al maíz, en la zafra 2009/2010 aproximadamente el 85% del maíz sembrado fue GM (unas 90 mil hectáreas). Asimismo, si bien el nuevo decreto crea una nueva estructura para bioseguridad en vegetales, deja a libre albedrío el etiquetado de transgénico/no-transgénico en el producto comercial final derivado del mismo. Teniendo en cuenta que el consumidor insiste en conocer exactamente qué es lo que está comprando tanto para consumo, procesamiento o para raciones animales, hemos encarado el poner a punto técnicas de biología molecular para la trazabilidad y determinación de transgénicos y utilizarlas en muestras reales de consumo masivo. En este trabajo se pusieron a punto las técnicas de extracción de ADN, PCR y electroforesis para rastreo de maíz transgénico mediante la detección del promotor 35S. Se seleccionaron para su análisis 20 muestras de harina de maíz ("polentas", proporcionadas y codificadas por el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo, Uruguay) en busca del promotor 35S, secuencia de ADN común a muchos eventos transgénicos y, en particular encontrada en los eventos Bt 11 y Mon 810, únicos autorizados para producción y consumo en Uruguay. Hecho el rastreo para determinar transgénesis, se determinó específicamente qué evento estaba presente en las mismas, buscando detectar maíz Bt11, Mon810 y Bt176 (muy utilizado en Argentina en 2006-7). De las 20 muestras recibidas, se pudo extraer ADN de 18 de ellas, las cuales resultaron todas positivas para el promotor 35 S, con 9 muestras positivas para Bt11 y Mon810, 5 muestras positivas sólo para Bt11, 4 muestras positivas sólo Mon810 y finalmente ninguna muestra resultó positiva para Bt176.

PCR-BASED ANALYSIS OF TRANSGENE PRESENCE IN 20 COMMERCIALY AVAILABLE CORNMEAL SAMPLES URUGUAY

Key words. Cornmeal. DNA, transgenesis, Bt

ABSTRACT

In this study we present data pertaining the presence of genetically modified maize in commercial cornmeal (polenta) samples consumed in Uruguay. When this study was conducted (2008), only two transgenic maize events were approved for sowing in Uruguay: Bt11 and Mon810; nevertheless, by the years 2008-2009, approximately 90% of cultivated maize was genetically modified. While recent improvements concerning biomonitoring of genetically modified organisms (GMOs) will be enforced in a novel biosecurity law, labelling of the final commercial products derived from GMOs is not mandatory, being left to the producer's decision. In contrast, many consumers insist on knowing the components of a product that is utilized for direct consumption, further processing or animal feed. Given this situation, we used molecular biology techniques to detect and identify if GM maize components were present in 20 commercially available cornmeals (polentas)

provided to us by the Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo. Furthermore, for this study we optimized DNA extraction, PCR amplification and acrylamide electrophoresis techniques in order to perform a screening for the 35S CaMV promoter (a recombinant sequence common in over 90% of currently available GM maize lines), as well as event-specific (Bt11, Bt176 and Mon810) genetic markers. We were able to obtain DNA from 18 out of 20 polenta samples: all 18 DNAs were positive for the 35S CaMV promoter; of these, 9 samples contained event-specific markers for both Mon810 and Bt11 events, while 5 were positive only for Bt11 and 4 were positive only for Mon810. None of the analyzed samples contained event Bt176 (which is extensively sowed in the neighbouring country of Argentina).

INTRODUCCIÓN

Durante la zafra 2009/2010, 15.4 millones de agricultores en 29 países plantaron cultivos transgénicos, más del 90% de estos países fueron naciones en desarrollo (ISAA, 2010). También fue el año en que se alcanzaron las 81 millones de hectáreas sembradas con OGMs en el mundo (solamente tres años después de que se alcanzaran las primeras 40 millones de hectáreas). La Unión Europea sigue resistiéndose a la aprobación de nuevos eventos modificados para liberación al ambiente y solamente autoriza los mismos para su utilización en alimentos animales, humanos y piensos. Sin embargo en Sudamérica el crecimiento de cultivos transgénicos liberados al ambiente sigue en alza, liderado por Argentina y Brasil (Marshall, 2009).

En Uruguay hasta el momento hay tres eventos aprobados para liberación al ambiente, maíz Bt11, maíz Mon810 y soja RR (40-3-2). En cuanto a las áreas de siembra, la soja transgénica ya ha alcanzado prácticamente el 100% del área total sembrada mientras que el maíz ha alcanzado casi el 90% (aproximadamente el 88% en la zafra 2008/2009) del área de maíz total sembrada, lo que equivale casi al 100% del total posible (hay que recordar que en Uruguay es obligatorio para el maíz plantar un 10% de maíz no transgénico como refugio) (Cámara Uruguaya de Semillas, CUS, 2009). De todas maneras aún hay muchos productores orgánicos que siembran maíz y soja no genéticamente modificados siendo el área de siembra no GM muy pequeña en comparación con el área GM total sembrada (que fue de

700 mil hectáreas GM aproximadas para la zafra 2008/2009, y que representaron un aumento en el área de siembra de un 40% en comparación con la zafra anterior, siendo éste el mayor aumento mundial de área de siembra para el período). En la zafra 2009/2010 se sembraron aproximadamente 880 mil hectáreas entre soja y maíz GM (ISAAA, 2010). Si bien los eventos aprobados hasta el momento son pocos en relación a otros países productores de transgénicos, estas cifras mantienen a Uruguay como el décimo país con mayor área de siembra de OGM en el mundo y el cuarto a nivel de Sudamérica por detrás de Brasil (25,4 millones de hectáreas), Argentina (22.9 millones de hectáreas) y Paraguay (2,6 millones de hectáreas) (ISAAA, 2010).

En Uruguay, el 21 de julio de 2008 se aprueba un nuevo Decreto de Ley (No. 353/008) que establece normas relativas a Bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas. Se establece la posibilidad de que nuevos eventos vegetales genéticamente modificados puedan ingresar al país bajo la previa evaluación de una nueva estructura orgánica en materia de Bioseguridad de Vegetales creada en el mismo decreto. Se trata de una primera etapa previa a la redacción de una Ley Nacional de Bioseguridad, la que sigue pendiente.

Dicho decreto establece una política de "coexistencia regulada" (Devos et al., 2009), reconociendo que los diferentes sistemas productivos: convencional, orgánico, o transgénico, tienen un rol a cumplir en la agropecuaria y por tanto es deseable promover el desarrollo de esos diferentes sistemas productivos.

En cuanto a lo que a trazabilidad de transgénicos en alimentos respecta, el Artículo 4º de este nuevo decreto establece que [se promoverán] “acciones tendientes a la implementación del etiquetado voluntario “GM” o “no GM”, aplicable a aquellos alimentos en los que se pueda comprobar mediante análisis del producto final la presencia de ADN o proteínas genéticamente modificados”.

Derechos de los consumidores. La preocupación de los consumidores en relación a la composición de los alimentos es cada vez mayor, y exigen información clara y exacta, dado que la elección de un producto puede estar relacionada con un estilo de vida (vegetarianismo, preferencia de productos “orgánicos”), problemas de salud (ausencia de lactosa o gluten), o temas religiosos (ausencia de cerdo para los judíos y musulmanes, y de vaca para los hindúes) (Rodríguez M, 1994). Por lo tanto, la descripción y/o etiquetado de los alimentos debe ser fidedigna y precisa.

La información que debe ser suministrada al consumidor final está regida por ley en la mayoría de los países, de manera que los alimentos deben coincidir exactamente con lo descrito en sus etiquetas. Así, se busca tanto proteger al consumidor como evitar una competencia desleal que afecte al comerciante honesto (Lumley, 1996). La descripción falsa, fraudulenta, de los contenidos de los alimentos en las etiquetas de los productos es un problema generalizado, dadas las importantes ganancias que puede producir (Patel, 1994, Ashurst and Dennis, 1996), particularmente en productos de alto valor agregado. Algunos casos de adulteración han generado graves problemas de salud, como la sustitución de algunas especias con óxido de plomo, o la adición de anticongelante al vino, o un contaminante tóxico al aceite de oliva (Vallejo, 2005). La mayoría de los casos de fraude alimenticio tienen consecuencias económicas más que de salud, ya que ningún

consumidor quiere pagar más por algo que lo que realmente vale (Al-Jowder, 1999).

Sin embargo, en el caso específico del maíz GM, se han encontrado efectos negativos inesperados en el estado sanitario de animales de laboratorio alimentados con derivados de cultivos transgénicos. Esto refuerza la necesidad de la detección e identificación de los OGMs que pudieran estar presentes en alimentos de consumo masivo (Séralini et al., 2007; Kilic and Akay, 2008; Finamore et al., 2008; Velimirov et al., 2008).

En Uruguay, se consume el maíz bajo muchas modalidades, siendo una de las más populares (por su bajo costo y la sencillez de preparación) la polenta, que consiste en granos de maíz pulverizados mecánicamente mediante molienda seca sin ningún proceso de cocción, de donde se obtienen grits que son preparados por hervido en agua salada con el agregado opcional de leche (Araya, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental utilizada en este trabajo para la detección e identificación de transgénicos en muestras de polenta se basó en la extracción de ADN a partir de las mismas y su posterior análisis mediante PCRs. Tanto la detección del transgénico como la identificación del evento específico se basaron en técnicas de PCR que utilizan cebadores específicos y posterior resolución de los amplicones obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los perfiles obtenidos para las muestras problema se compararon con controles positivos y negativos de maíz transgénico. Algunas de los amplicones se secuenciaron para lograr una ulterior confirmación de los resultados.

Muestras utilizadas.

Las muestras empleadas para la realización de los análisis fueron 20 polentas (harinas de maíz) proporcionadas por el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo. Todas las muestras se

encuentran actualmente en el mercado. Cada muestra fue entregada al laboratorio correctamente sellada para que no exista transferencia de material entre ellas y además diferenciadas mediante un código, tal que, solamente el personal del Laboratorio de Bromatología tenía conocimiento del origen de cada una. Tanto los controles positivos como los controles negativos de maíz fueron proporcionados por el INASE (Instituto Nacional de Semillas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Se usaron controles positivos genéricos para maíz (invertasa), promotor del virus del mosaico del coliflor (35S, transgénesis), así como para los eventos Bt11, Mon810, Bt176.

Descontaminación del lugar y elementos de trabajo.

Las mesadas, morteros y pipetas fueron descontaminados antes de cada experimento siguiendo los siguientes pasos: 5 minutos en Hipoclorito de Sodio 10%, 5 minutos en alcohol 70% y posterior lavado con H₂O milliRo. Se utilizaron guantes libres de "talco" en todas las etapas experimentales debido a razones que más adelante se discutirán.

Extracción de ADN.

Las muestras fueron homogeneizadas utilizando morteros de cerámica (previamente autoclavados y descontaminados) hasta obtener polvillo fino. Para las extracciones de ADN se utilizó el protocolo reportado por Dellaporta et al (Dellaporta, 1983) con pequeñas modificaciones: a 70 mg de muestra homogenizada se le agregan 700µL de Buffer de extracción (Tris-HCl 50mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0; NaCl 100mM; SDS 1%; β-mercaptoetanol 10 mM). Se mezcla por inversión unas 10 veces y se incuba a 65 °C durante 20min, agitando cada 2 min. Posteriormente se agregan 200 µL de acetato de potasio 5M, se invierte el tubo 5 veces, y se incuba en hielo por 10 min. Luego se centrifuga a 12000 rpm por 20 min, y se toman

500µL del sobrenadante, a los cuales se les agregan 500µL de isopropanol y se mezcla por inversión unas 10 veces. Se centrifuga por 15 min a 12000 rpm, y luego de descartar el sobrenadante se agregan 250µL de etanol 70%, centrifugando nuevamente por 5 min a 12000 rpm. Por último, se descarta el sobrenadante, se seca el precipitado, se resuspende en 100µL de agua mQ y se guarda en freezer a -20°C hasta su posterior utilización.

La concentración y pureza de los ADNs extraídos de las muestras se estimaron mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. A partir de estas lecturas se calcularon y prepararon las diluciones de trabajo (100 ng/µL).

La integridad del ADN extraído fue estimada mediante electroforesis en agarosa 1% con el agregado de Bromuro de Etidio, concentración final de 0,01mg/ml. Se sembraron 10 µL de los 100 totales. Los geles se corrieron en buffer TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA).

El ADN se visualizó en un transiluminador UV (254nm). Se compararon los perfiles de los ADNs obtenidos con un estándar de peso molecular λ/HindIII.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador de punto final (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer). Las muestras a ser analizadas fueron preparadas para la PCR en una zona exclusiva (sala de pre-PCR) descontaminada (según descripto anteriormente) previo a cada análisis.

Detección de transgénesis e identificación de eventos.

Para la detección se utilizaron los cebadores 35S-1 y 35S2 que amplifican una región del promotor 35S, utilizado en más del 95% de los eventos transgénicos (Hurst, 1999). El tamaño del amplicón es de 195pb. cada

tubo contenía 1µL de ADN molde, 1µL de cada cebador 35S-1 y 35S-2 [10µM], 0,2µL Taq polimerasa Fermentas (equivalente a 1U), 0,2µL de solución dNTPs Fermentas (25mM), 2,5µL Buffer KCl (10x), 2,5µL de MgCl₂ (25mM) y H₂O mQ c.s.p. 25µL. El termociclador fue programado para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C. Por último un ciclo de elongación de 7 minutos a 72°C.

Para el resto de las reacciones, es decir, control endógeno de maíz y determinación de los eventos Bt11, Mon810 y Bt176, se utilizó el mismo protocolo que para el rastreo de 35S pero usando los cebadores específicos correspondientes. Para Bt11: IVS2-2/PAT-B con un amplicón de 189 pb; para Mon810: VW01/VW03 con un amplicón de 170pb; para Bt176 Cry05/Cry06 con un amplicón de 134 inv) endógeno de maíz IVR1/IVR2 con un amplicón pb. (Tabla 1).

Tabla 1: Lista de oligonucleótidos utilizados en las PCRs.

Especificidad	Nombre	Secuencia 5'→3'	Tamaño amplicón (pb)	Tm (°C)	Referencia
Maíz	IVR-1	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC	226	69.5	Ehlers et al., 1997
Maíz	IVR-2	GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC		69.5	Ehlers et al., 1997
GM	35S-1	GCTCCTACAAATGCCATCA	195	58	JRC
GM	35S-2	GATAGTGGGATTGTGCGTCA		60.4	JRC
Evento Bt11	PAT-B	GCTGCTGTAGCTGGCCTAATCT	189	64.54	JRC
Evento Bt11	IVS2-2	CTGGGAGGCCAAGGTATCTAAT		62.52	JRC
Evento Mon810	VW01	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG	170	64.55	JRC
Evento Mon810	VW03	TCCATCTTTGGGACCACTGTCTG		64.54	JRC
Evento Bt176	Cry05	CCGCAGCCGATCCAACAATG	134	64.5	JRC
Evento Bt176	Cry06	GCTGATGTCGATGGGGGTGTAG		66.4	JRC

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La visualización de los productos de PCR (7 µL de 25 totales) se realizó en mini-geles de poliacrilamida, preparados con 7mL de acrilamida-bisacrilamida 6% en tampón TBE 1X (90mM Tris base, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA pH 8.0), 7µL TEMED, y 70µL de Persulfato de amonio 10%. Los mini-geles se revelaron mediante la técnica de tinción de plata con modificaciones (Sanguinetti, 1994): luego de la electroforesis fueron incubados por 5 min en solución fijadora (10% etanol y 0,5% ácido acético glacial en H₂O mRO) con agitación constante, posteriormente 8 min en solución de plata (0,225% AgNO₃ en H₂O mRO), luego se lavan 2 veces en agua mRO durante aproximadamente 30 segundos y por último se exponen al revelador (3% NaOH; 0,12% formaldehído en H₂O mRO) hasta que se completa la tinción. Para detener la reacción de tinción se deben colocar nuevamente en la solución fijadora por un par

de minutos con el fin de evitar que se sobreexpongan. Los mini-geles –una vez revelados- son escaneados y conservados para su posterior análisis en sobres de nylon sellados y guardados a temperatura ambiente.

Electroforesis en geles de agarosa 2%.

Los geles se prepararon y corrieron en las mismas condiciones que los 1%, con la diferencia que se utilizaron 2 gr. De agarosa cada 100 mL. de buffer TAE y un Ladder 100 pb (Fermentas) como estándar de peso molecular.

Secuenciación de los Productos de PCR.

El remanente de algunas de las reacciones de PCR (aproximadamente 18 uL) fueron purificados en columnas AxyPrep PCR Clean-up Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante, y la solución de ADN eluido fue concentrada hasta 10 uL en un secador vacuomotorio (Speed-Vac). Un uL fue usado para

confirmar en un mini gel de acrilamida 6%, en las mismas condiciones que antes, la presencia e integridad del ADN recuperado. Del volumen restante, se utilizó otro uL para cuantificar el ADN en un espectrómetro Nano Drop (ACTGene ASP-3700) y el volumen remanente (8 uL aprox.) se enviaron a secuenciación directa al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. El resultado de la secuenciación fue analizado

contrastándolo contra la base de datos del GenBank mediante el algoritmo Blastn.

RESULTADOS

Extracciones de ADN.

Tal como se aprecia en la Figura 1 y la Tabla 2, el método de Dellaporta funcionó bien para trabajar con este tipo de matrices alimentarias.

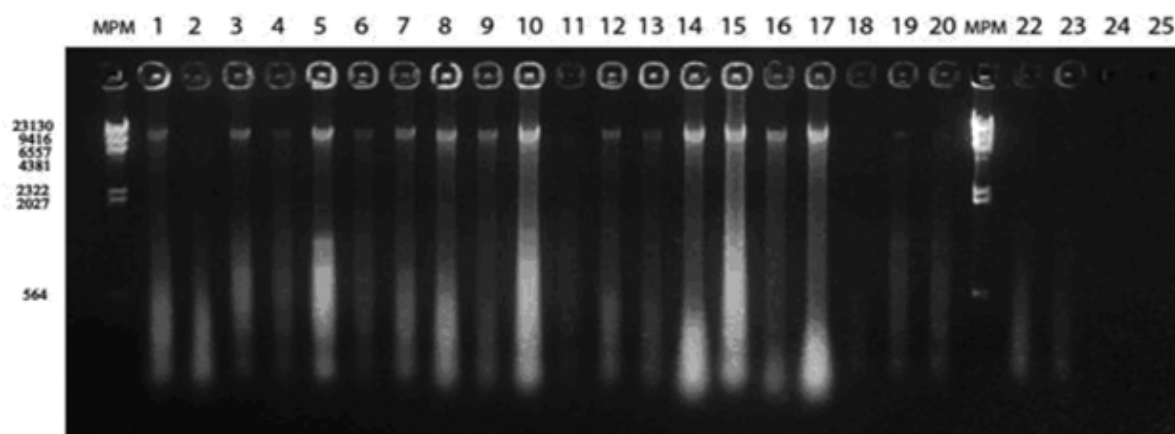


Figura 1: Resultado de la electroforesis en gel de Agarosa 1% (con Bromuro de Etidio) de las extracciones de ADN de las veinte muestras analizadas (M1-20, carriles 1-20, 22, 23), el marcador de peso molecular utilizado como referencia (carriles 1 y 22) fue λ /HindIII, y los pesos moleculares de sus fragmentos se indican a la izquierda.

Dado que las muestras M2 y M18 no produjeron un perfil apreciable de ADN en la corrida electroforética en agarosa, se repitió su extracción, aunque nuevamente sin resultados positivos (Figura 1). Si bien las medidas de Abs260 (Tabla 2) fueron consistentes con los resultados mostrados en la Figura 1, solamente 5 polentas mostraron una relación Abs260/Abs280 dentro del óptimo de pureza (entre 1,6 y 1,8) (Gallagher and Desjardins, 2001). De las restantes, cinco polentas mostraron relación de absorbancia entre 1,3 y 1,6 y el resto de las veinte muestras resultados entre 1,1 y 1,3. De todas maneras, excepto M2 y M18, todas las muestras amplificaron correctamente en las posteriores PCR. La relación de Abs260/A280 de la muestra M2 fue 1,227 y la de la muestra

M18 fue 1,100, con medidas de Abs260 de 2135ng/ μ l y 2040 ng/ μ l respectivamente (Tabla 2).

Detección de transgénesis e identificación de eventos.

Todas las muestras de las que se pudo extraer ADN amplificable (18/20) son positivas al utilizar los cebadores 35S (ver Figura 2 como ejemplo de amplificación del promotor 35S, banda de 195 pb), lo que nos indica la presencia de material genéticamente modificado. Asimismo, se obtuvo la banda esperada de 226 pb cuando se utilizaron los cebadores IVR-1 e IVR-2 sobre las mismas muestras, resultando M2 y M18 nuevamente negativas (datos no mostrados). Los resultados (ver Tabla 3) arrojan que el evento BT176 no

está presente en ninguna de las muestras pero si lo están los eventos Mon810 y BT11. Se encontró el evento Mon810 en trece de las muestras mientras que el Bt11 en 14 de ellas (Mon810 positivo y Bt11 negativo en cuatro muestras, Bt11 positivo y Mon810 negativo en cinco, y los dos en nueve) (Figura 3).

Tabla 2: Medidas de Abs₂₆₀, A₂₈₀, relación Abs_{260/280}, y concentración de ácidos nucleicos en ng/μl para las muestras analizadas (M1-M20).

Muestra	A260	A280	A260/A280	[ADN] ng/μL
M1	0,150	0,105	1,428	750
M2	0,427	0,348	1,227	2135
M3	0,094	0,060	1,572	470
M4	0,128	0,105	1,224	640
M5	0,226	0,149	1,523	1130
M6	0,174	0,149	1,167	870
M7	0,088	0,051	1,726	440
M8	0,293	0,212	1,380	1465
M9	0,204	0,168	1,215	1020
M10	0,378	0,236	1,605	1890
M11	0,179	0,160	1,119	895
M12	0,409	0,356	1,147	2045
M13	0,304	0,236	1,157	1520
M14	0,346	0,216	1,604	1730
M15	0,375	0,226	1,657	1875
M16	0,196	0,150	1,305	980
M17	0,321	0,185	1,730	1605
M18	0,408	0,371	1,100	2040
M19	0,299	0,249	1,201	1495
M20	0,387	0,329	1,174	1935

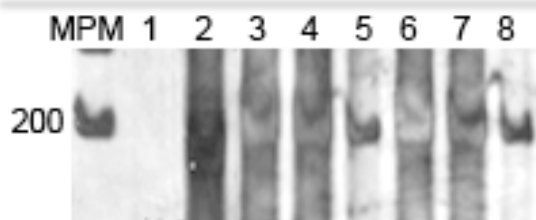


Figura 2: Detección de transgénesis. Resultado de la electroforesis en gel de poli-acrilamida 6% teñido con Ag⁺. Se aprecia la banda correspondiente al amplicón de 195 pb generado por la PCR utilizando los cebadores 35S1 y 35S2 y los moldes de ADN obtenidos a partir de seis de las veinte muestras de polentas analizadas. Existe reacción positiva en las seis polentas analizadas en este experimento. MPM: Marcador de peso molecular L100, Carril 1: Control negativo. 2-7: Muestras M10-M15. 8: Control positivo.

Como ulterior confirmación de que las bandas obtenidas por PCR correspondían a los eventos analizados, decidimos realizar una secuenciación directa de algunos de los productos de PCR obtenidos. En todos los casos hubo coincidencia entre los resultados de las PCRs y posteriores electroforesis, y las secuencias nucleotídicas obtenidas (datos no mostrados).

Tabla 3. Resultado del rastreo del promotor 35-S, control endógeno IVR y la identificación de eventos Bt11, Mon810 y Bt176 para las 20 harinas de maíz M1-M20, analizadas mediante PCRs y posteriores electroforesis en geles de acrilamida 6% (no mostrados para los eventos ni IVR) y agarosa 2%. Se puede observar que luego de realizar la PCR no se obtuvieron resultados positivos que muestren la presencia de ADN en las muestras M2 y M18, y tampoco se detectó el evento Bt176 en ninguna de las 20 muestras. El resto de las muestras presentan una de las 3 posibles combinaciones de Bt11 y Mon810 (mezcla, solo Bt11 o solo Mon810).

	IVR	35-S	Bt11	Mon810	Bt176
M1	+	+	+	+	-
M2	-	-	-	-	-
M3	+	+	+	-	-
M4	+	+	+	-	-
M5	+	+	+	+	-
M6	+	+	+	+	-
M7	+	+	+	+	-
M8	+	+	+	+	-
M9	+	+	+	+	-
M10	+	+	-	+	-
M11	+	+	+	-	-
M12	+	+	-	+	-
M13	+	+	-	+	-
M14	+	+	+	+	-
M15	+	+	-	+	-
M16	+	+	+	+	-
M17	+	+	+	+	-
M18	-	-	-	-	-
M19	+	+	+	-	-
M20	+	+	+	-	-

*: resultaron claramente positivos en acrilamida 6% y negativos en agarosa 2%.

DISCUSIÓN

Extracciones de ADN

Tal como se muestra en la Figura 1, el método de Dellaporta modificado resultó eficiente tanto en la cantidad como en la

calidad del ADN obtenido para dieciocho de las veinte muestras de harinas de maíz analizadas. En todas las muestras (menos M2 y M18) se puede apreciar la presencia de una banda de alto peso molecular lo que indica que se obtuvo ADN de buena calidad para utilizar en las posteriores PCRs. Para la muestras M2 y

M18 se realizaron al menos tres intentos de extracción de ADN mediante el protocolo Dellaporta (así como utilizando el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, datos no mostrados) sin obtener resultados positivos en las PCRs.

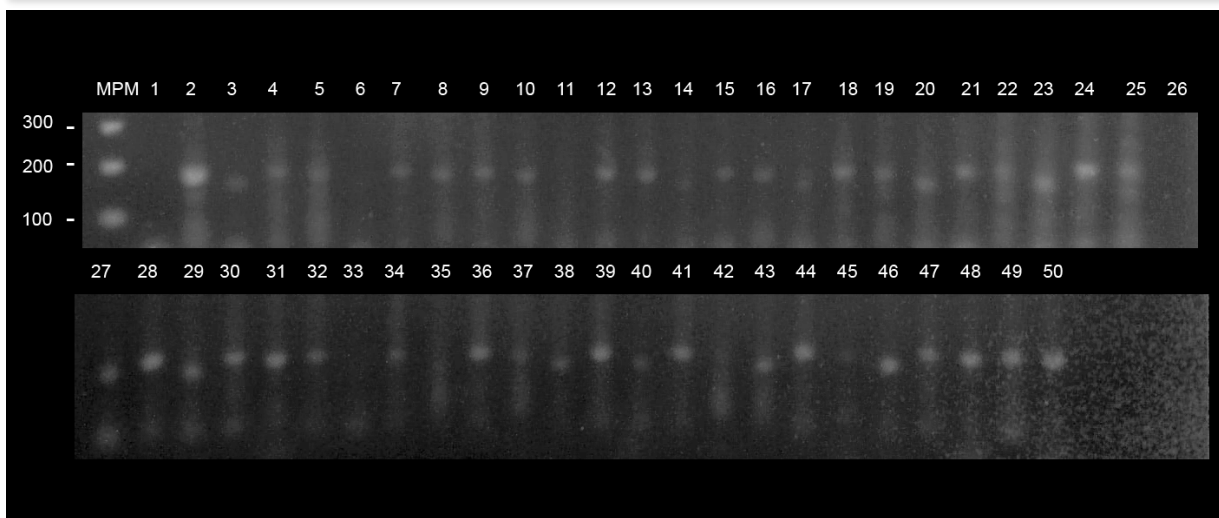


Figura 3: Identificación de Eventos. Electroforesis en gel de agarosa 2% (con bromuro de etidio) mostrando el resultado de las PCR evento-específicas. Sólo se sembraron las muestras que mostraron resultado positivo en un análisis previo de electroforesis en acrilamida (datos no mostrados). 1: Marcador de peso molecular L100, 2: C(+) 35S, 3: C(+) Bt11, 4: C(+) Mon810, 5: M1 35S, 6: M1 Bt11, 7: M1 Mon810, 8: M3 35S, 9: M3 Bt11, 10: M4 35S, 11: M4 Bt11, 12: M4 Mon810, 13: M5 35S, 14: M5 Bt11, 15: M5 Mon810, 16: M6 35S, 17: M6 Bt11, 18: M6 Mon810, 19: M7 35S, 20: M7 Bt11, 21: M7 Mon810, 22: M8 35S, 23: M8 Bt11, 24: M8 Mon810, 25: M9 35S, 26: M9 Bt11, 27: M9 Mon810, 28: M10 35S, 29: M10 Mon810, 30: M11 35S, 31: M11 Bt11, 32: M12 35S, 33: M12 Mon810, 34: M13 35S, 35: M13 Mon810, 36: M14 35S, 37: M14 Bt11, 38: M14 Mon810, 39: M15 35S, 40: M15 Mon810, 41: M16 35S, 42: M16 Bt11, 43: M16 Mon810, 44: M17 35S, 45: M17 Bt11, 46: M17 Mon810, 47: M19 35S, 48: M19 Bt11, 49: M20 35S, 50: M20 Bt11. No se analizaron ni M2 ni M18, ya que habían resultado negativas para 35S, Mon810, Bt11, Bt176 e IVR.

En las etapas iniciales del trabajo, notamos que almidón de maíz presente en los guantes (Hinsch, 2009) era un foco importante de contaminación durante la manipulación, principalmente durante la preparación de las PCR, lo que se evidenció por la aparición de falsos positivos (i.e. señales positivas en los controles negativos sin ADN). Por esta razón se decidió utilizar guantes sin almidón durante los experimentos, lo que redujo considerablemente el número de muestras contaminadas por lo tanto de falsos positivos en los resultados finales. En cuanto al método

de extracción, concluimos que el método Dellaporta modificado (originalmente descrito para la extracción de ADN de muestras vegetales, cita), rápido y económico, funciona muy bien para la matriz alimentaria tipo polenta.

Si bien las medidas de Abs260 fueron consistentes con los resultados mostrados en la Fig.1, solamente cinco polentas mostraron una relación Abs260/Abs280 dentro del óptimo de pureza (Gallagher and Desjardins, 2001) (entre 1,6 y 1,8, Tabla 2). De las restantes, cinco polentas mostraron relación

de absorbancia entre 1,3 y 1,6 y el resto de las 20 muestras resultados entre 1,1 y 1,3. De todas maneras, excepto M2 y M18, todas las muestras amplificaron correctamente en las posteriores PCR. La relación de Abs260/280 de la muestra M2 fue 1,227 y la de la muestra M18 fue 1,100. Además mostraron medidas de Abs260 de 2135 ng/ μ l y 2040 ng/ μ l respectivamente. (Tabla 2). Si bien es posible que esta inconsistencia sea debido a errores técnicos en la manipulación durante las extracciones de ADN o durante las medidas de absorbancia, ambos procedimientos fueron repetidos varias veces, por lo que no se puede descartar que en esas polentas el ADN estuviese tan degradado que no puedan utilizarse los métodos de detección e identificación usados en este trabajo. Si este fuera el caso, también justificaría las altas medidas de Abs260 que se observaron en ambas muestras ya que podríamos estar midiendo fragmentos sumamente pequeños de ADN o inclusive bases sueltas en grandes cantidades, sin que esto se refleje en bandas de alto peso en las agarosas ni posteriores resultados positivos durante las PCR.

De estas muestras M2 y M18 no puede asegurarse ni que contienen material GM ni que no lo tienen. En primer lugar porque al no aparecer un amplicón de PCR podría significar que en esos carriles no funcionó la PCR y en segundo lugar porque podrían contener transgénicos que contienen en su construcción un promotor diferente al 35S (Ahmed, 2001). Además se suma el hecho de que no pudo obtenerse ADN de buena calidad durante las extracciones, por lo que a las dos posibilidades anteriores se les suman también los posibles errores de manipulación durante las extracciones (y a pesar de que se utilizaron dos métodos diferentes, incluyendo uno comercial) o la alta degradación del ADN de esas muestras. No obstante, la falta de amplificación de las muestras M2 y M18 en todos los casos, -y principalmente la ausencia de amplicón para las corridas realizadas con el

par IVR1/IVR2 que amplifican el gen *iv* endógeno de maíz- nos confirmarían la hipótesis de que sea cual sea la razón, no pudo extraerse ADN amplificable de estas muestras.

Detección de transgénesis e identificación de eventos.

Los resultados de las PCRs de rastreo y control endógeno (35S e IVR), así como las detección de eventos (Mon810, Bt11 y Bt176) se analizaron por electroforesis en geles de poli(acrilamida) 6% teñidos con nitrato de plata y por agarosa 2% (Figuras. 2 y 3). La metodología de análisis por geles de poli(acrilamida) presenta varias ventajas con respecto a la utilización de agarosa 2% (adicionada de bromuro de etidio), a saber: rapidez, costo, la no utilización de un agente probablemente mutágeno. La alta sensibilidad (por lo menos diez veces mayor con respecto a la agarosa) es a la vez una ventaja y una desventaja, ya que en ocasiones se pueden producir contaminaciones de un carril a otro (carry over), lo que puede complicar la interpretación de los resultados. El resultado final (Tabla 3) surge de la triple repetición de cada análisis. Asimismo, y para adecuarnos a los estándares analíticos corrientes, decidimos utilizar el resto de las reacciones de PCR (aproximadamente 15 de 25 μ l totales) para sembrar en geles de agarosa 2% (Fig. 4).

Dado que el amplicón correspondiente al evento Bt176 (134pb) no apareció en ninguna de las muestras (y dado que el método utilizado para identificarlo es específico de construcción) podemos afirmar que este evento (utilizado en Argentina en 2006-7) no se encuentra en ninguna de las muestras, ni siquiera como un apilado (stacked) o en alguna planta híbrida al menos dentro de los límites de detección de la metodología y las limitantes de la estrategia de muestreo.

El par de cebadores utilizados para identificar Mon810 (VW01/VW03), son específicos de evento, lo cual implicaría en primera instancia que al generar un amplicón

de 170pb estaríamos frente a una muestra que contiene dicho evento. Lo que no podemos saber con este análisis es si, la planta o el alimento que se está analizando contienen material híbrido entre plantas genéticamente modificadas o si es un evento apilado distinto al Mon810 que fue generado por hibridización de eventos GM utilizando como uno de los parentales al Mon810. Dicho lo anterior se puede concluir que las 4 muestras cuyos análisis dieron positivos solo para el par VW01/VW03 podrían contener los eventos comerciales Mon810, Mon810 x NK603 (presente en Argentina y Brasil y generado por hibridización de eventos parentales NK603 y Mon810) y cualquier otro híbrido no comercial que tenga como parental una planta Mon810.

La mención a posibles híbridos generados entre plantas pertenecientes a diferentes eventos se justifica pues es sabido que las distancias reglamentarias entre cultivos GM y no GM (250 mts. en Uruguay), claves para el modelo de "coexistencia" (Sanvido et al., 2008; Devos et al., 2009), están lejos de cumplirse cabalmente y aún cuando se respetan, existe flujo génico a través del polen entre plantas GM y no GM (ver por ej. Galeano et al, 2011).

Para el caso de los resultados positivos para el par PAT-B/IVS-2 (Bt11), es más complicado aún, ya que estos cebadores son específicos de construcción. Esto implica que si luego de la PCR se genera un amplicón de 189pb no podemos afirmar que el evento presente sea necesariamente Bt11 sino que puede ser también cualquiera de los eventos apilados que hay en mercado que contienen la construcción Bt11, sea cual sea su método de producción, además de cualquier híbrido que tenga como parental una planta Bt11. Las 5 muestras que dieron positivas para el par PAT-B/IVS-2 entonces, podrían contener Bt11, Bt11xGA21 (aprobado en Brasil y Argentina) y cualquier otro híbrido no comercial que tenga como parental una planta Bt11.

Como sabemos además que las harinas de maíz son generalmente mezclas de granos de

varias chacras estamos frente a la posibilidad que no solo una de las opciones descriptas más arriba sea la correcta, sino que la polenta analizada sea una mezcla de varias de las posibilidades anteriores.

En los 9 casos en que las muestras dieron positivo tanto para PAT-B/IVS-2 como VW01/VW03 las posibilidades de mezcla son mucho más grandes ya que implicarían las combinaciones de todas las anteriores.

Debido a que para realizar el rastreo de OGMs se utilizó únicamente el promotor 35S, quedaron fuera del análisis todos los eventos de maíz que utilizan promotores diferentes a este. Si bien en Uruguay no hay eventos liberados hasta el momento que contengan otros promotores, si los hay en Argentina y Brasil, ambos países grandes exportadores de alimentos hacia Uruguay. Por lo tanto quedaron fuera del análisis los eventos tales como el GA21 (que utiliza el promotor I de actina de arroz) y el TC1507 (con el promotor ubiquitina de maíz); entre otros (GMDatabase, 2009).

Es importante destacar que todas las metodologías aplicadas en este trabajo son cualitativas y solamente sirven para confirmar la presencia ausencia de un determinado evento o grupo de eventos. Sería importante poner a punto los análisis cuantitativos de determinación e identificación ya que es la única manera de poder cumplir con los análisis exigidos para realizar exportaciones a mercados como la Unión Europea (que exige umbrales específicos de presencia). De todas maneras para las necesidades locales basta con poder determinar la presencia o ausencia de material GM en la muestra problema ya que no existen umbrales establecidos por ley.

Por último, es primordial para poder estandarizar y certificar los métodos utilizados el poder acceder a los materiales de referencia de cada uno de los eventos y de maíz no GM. Estos materiales de referencia son sumamente difíciles de conseguir, lo cual dificulta el poder poner a punto las metodologías de análisis.

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos puesto a punto la extracción de ADN -y su posterior amplificación por PCR- a partir de la matriz alimentaria "polenta", elaborada a partir de harina de maíz, y de amplio consumo en nuestra región.

De las 20 muestras de polenta (enviadas codificadas por el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo) se pudo obtener ADN analizable a partir de 18 de ellas mediante una modificación del protocolo de extracción de Dellaporta. Dichas muestras fueron analizadas mediante PCR en busca del promotor 35S presente en todos los eventos transgénicos aprobados hasta el momento en el Uruguay y el resultado fue positivo para todas, por lo que se concluye que el 100% de las muestras analizadas están elaboradas al menos en parte por maíz genéticamente modificado.

Posteriormente se pasó a identificar la presencia de los eventos Mon810, Bt11 y Bt176 para las muestras. Los resultados arrojan que el evento Bt176 no está presente en ninguna de las muestras pero si lo están los eventos Mon810 y Bt11. Se encontró el evento Mon810 en 13 de las muestras y el Bt11 en 14 de ellas (sólo Mon810 en 4 muestras, solo Bt11 en 5 y mezcla de ambos en 9 de ellas). Esto indicaría no sólo la presencia de Mon810 y Bt11 en las muestras, sino también la posibilidad de varios eventos apilados de los cuales Mon810 y Bt11 forman parte.

Si el 100% de las harinas de maíz de las que se pudo obtener ADN contenían maíz genéticamente modificado, es de esperar que muchos alimentos elaborados a base de maíz como galletas, pan, aceites, raciones animales, entre muchos otros, también lo contengan. Durante la puesta a punto de las metodologías se analizaron "nachos" y "cereales de desayuno" de marcas conocidas y ambos tipos de productos también contenían maíz GM.

Aunque la legislación de nuestro país no exige el etiquetado transgénico en producto

final, es de prever que tanto los productores que trabajan con variedades híbridas no genéticamente modificadas como los que lo hacen con maíces criollos u orgánicos, comiencen a etiquetar sus productos para poder diferenciarlos de los productos transgénicos y de esta manera poder darles cierto valor agregado, creando la necesidad de tener laboratorios que realicen los análisis y puedan certificar la presencia o ausencia de ingredientes genéticamente modificados en un producto determinado.

Si el país aprueba ser parte del Protocolo de Cartagena, a nivel de importaciones se deberán analizar los cargamentos para constatar que las semillas ingresadas, sea para liberación al ambiente o para consumo humano, animal o pienso, contengan los eventos declarados y no otros diferentes, algo imposible de determinar a simple vista. Además, deberán analizarse los cargamentos que estén declarados como sin contenido de material genéticamente modificado para descartar posibles fraudes o contaminaciones. Sumado a esto, deberán analizarse los cargamentos a exportar para asegurar el cumplimiento de las exigencias impuestas por el importador. Es bien sabido que muchos países de la Unión Europea tienen estrictos controles sobre los alimentos derivados de OGMs por lo que es importante asegurar que los productos que se exporten hacia allí cumplan con las normas establecidas.

Si bien hasta la fecha en nuestro país hay aprobados para liberación al ambiente únicamente tres eventos transgénicos (Bt11, Mon810 y Soja RR), ya se encuentran desde el año pasado varios eventos de maíz en etapa de evaluación agronómica (ej. GA21, NK603, TC1507, GA21XBT11 y MON810XNK603, estos dos últimos eventos del tipo "apilado"), y se estima que otros tantos entren al mismo proceso este año. Esto muestra la necesidad de poner a punto a corto plazo todas las metodologías de trazabilidad para estos eventos.

Por último, pero no menos importante, y dado se han encontrado efectos negativos inesperados en la salud debido al consumo de alimentos derivados de cultivos transgénicos, se refuerza la necesidad de la detección e identificación de los OGMs que pudieran estar presentes en alimentos de consumo masivo

AGRADECIMIENTOS

Alma Piñeyro, Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo, CSIC-UdelaR.

REFERENCIAS

- Ahmed, F. E. 2001. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20 (5), 215-223.
- Al-Jowder, O., M., Defernez, E., Kemsley, and R., Wilson. 1999. Mid-Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Authentication of Meat Products. *J. Agric. Food. Chem.*, 47, 3210-3218.
- Araya, J. 1996. Producción de Harinas. Tesis para obtención de título Técnico Universitario en Industria Alimentaria - Universidad de Santiago de Chile . Chile.
- Ashurst, P., and M., Dennis (1996). *Food Authentication*. London: Blackie Academic and Professional-Chapman and Hall.
- CUS (Cámara Uruguaya de Semillas). 2009. Comunicación personal.
- Dellaporta, S. L., J., Wood, and J. B.Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19-21.
- Devos Y., M., Demont, K., Dillen, D., Reheul, M., Kaiser and O., Sanvido. 2009. Coexistence of genetically modified (GM) and non-GM crops in the European Union. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 29: 11-30.
- Ehlers B., E., Strauch, M., Goltz, D., Kubsch, H., Wagner, H., Maidhof, J., Bendiek, B., Appel and H.J.,Buhk. 1997. Nachweis gentechnischer Veränderungen inMais mittels PCR. *Bundesgesundheitsblatt* 40: 118-121.
- Finamore, A., M., Roselli, S., Britti, G., Monastra, R., Ambra, A., Turrini and E. Mengheri. 2008. Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11533-11539.
- Gallagher, S. R., and P. R. Desjardins. 2001. *Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Inc.
- GMDatabase. 2009. AGBIOS. Obtenido de Agriculture and Biotechnology Strategies Inc.: <http://www.agbios.com>.
- Hinsch, M. 2009. Cornstarch Powder and Medical Gloves, a Dire Combination. *Staff Safety* , 94-98.
- Hurst, C. D., A., Knight and I., Bruce. 1999. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding*, 5, 579-586.
- ISAAA. (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications). 2009. Informe anual. www.isaaa.org/
- ISAAA. (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications). 2010. Informe anual. www.isaaa.org/
- JRC, Joint Research Centre de la Unión Europea, <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>
- Kilic, A., and M.T. Akay. 2008. A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1164-1170.
- Lumley, I. (1996). *Food Authentication*. London: Blackie Academic and Professional-Chapman and Hall.
- Marshall, A. (2009). 13.3 million farmers cultivate GM crops. *Nature Biotechnology*, 27 (3), 221.
- Patel, T. (1994). Real juice, pure fraud. *New Scientist* , 26-30.
- Rodríguez, M., T. García, I., González, L., Asensio, P., Hernández and R., Martín. 1994. PCR Identification of Beef, Sheep,

- Goat, and Pork in Raw and Heat-Treated Meat Mixtures. *J. Food Protection*, 67, 172-177.
- Sanguinetti, C. J., E., Días Neto, and A. J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17, 914-921.
- Sanvido O, F., Widmer, M., Winzeler, B., Streit, E., Szerencsits and F., Bigler. 2008. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Res.* 17: 317–335
- Séralini, G.-E., D., Cellier, and J.S., de Vendomois. 2007. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. *Arch. Environ Contam Toxicol.* 52, 596–602.
- Vallejo, B., A., González, M., Mazorra, and R., Rodríguez. 2005. Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *J. Sep. Sci.*, 28, 826-836.
- Velimirov, A., C., Binter, and J., Zentek. 2008. Biological effects of transgenic maize NK603xMON810 fed in long term reproduction studies in mice. Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend Report, Forschungsberichte der Sektion IV Band 3/2008, Austria.
-