

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 de Lourdes Torres^{1*}, Lorena Mejía¹ y Venancio Arahana¹

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: ltorres@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Sonia Zapata, Ph.D.

Recibido/Received: 07/05/2013. Aceptado/Accepted: 27/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Soybean is a crop with a national production in Ecuador 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 approved. As a consequence, there is a probability of finding this type of soybean in Ecuadorian territory. In this research, a detection and quantification SYBR Green-based method of genetically modified soybean was standardized. Primers used for the amplification corresponded to specific sequences of the two most representative recombinant elements in GM (genetically modified) crops, the 35S promoter from the Cauliflower Mosaic Virus (P35S) and NOS terminator from Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* (TNOS). These elements generated 200bp and 69bp amplicons respectively. The quantitative analysis was performed generating a standard curve based on the amplification of certified reference materials with 0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 % of GM soybean event GTS 40-3-2, using the above mentioned primers. The detection limit was set at 0.01 % while the quantification limit was set at 0.1 %. In 2 of the 26 soybean samples analyzed, more than 0.1 % of GMOs was found (sample 22 with 0.2 % and sample 23 with 14 %). Additionally, adventitious GMO presence was detected in 8 of the tested samples. Due to Ecuadorian GMO regulations, this kind of analysis is important in order to determine the presence of GMOs in Ecuador, and is clear evidence for the need of trained personnel and specialized institutions for the detection and analysis of GMOs.

Keywords. transgenic, soybean, GMO detection, GM crops, quantification

Resumen

La soya es un cultivo cuya producción nacional en el Ecuador no es suficiente para suplir la demanda interna. Por esta razón, se recurre a la importación de semilla de soya para siembra y soya en grano para consumo, desde países donde el uso de soya transgénica ha sido aprobado. Como consecuencia, existe la probabilidad del ingreso de este cultivo a territorio ecuatoriano. En esta investigación, se estandarizó una metodología para la detección y cuantificación de soya genéticamente modificada con tecnología SYBR Green. Los primers utilizados para la amplificación corresponden a secuencias específicas de los dos elementos recombinantes más representativos en soya genéticamente modificada, 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. El análisis cuantitativo se realizó a partir de la generación de una curva estándar en base a la amplificación usando 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 %. En 2 de las 26 muestras de soya analizadas se encontró más del 0.1 % de OGM (organismo genéticamente modificado) (muestra 22 con 0.2 % y la muestra 23 con 14 %). Además se detectó presencia adventicia de soya transgénica en 8 de las muestras estudiadas. Debido a las regulaciones de OGMs que existen en el Ecuador, este tipo de análisis es importante para confirmar la presencia de OGMs 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.

Palabras Clave. transgénicos, soya, detección de OGMs, cultivo GM, detección, cuantificación

Introducción

A lo largo de la historia, el uso y aceptación de nuevas tecnologías han pasado por un proceso de resistencia, miedo e incluso escepticismo. El uso de las diversas biotecnologías modernas en la producción de alimentos (plantas y animales) no es la excepción, puesto que ha sido objeto de un profundo debate público y político. Un gran porcentaje de estas discusiones se ha centrado principalmente en los organismos genéticamente modificados (OGMs), también conocidos como transgénicos, que pueden tener características particulares gracias a la inserción, delección o silenciamiento de genes específicos en su genoma mediante la técnica de ADN recombinante. Este procedimiento les confiere las características deseadas [1].

En la actualidad, existen cientos de OGMs, que abarcan modificaciones en bacterias, hongos, animales y plantas. Sin embargo, las plantas genéticamente modificadas han generado hasta el momento el mayor debate y regulación. Es así, que de acuerdo a diferentes regulaciones nacionales e internacionales vigentes en muchos países, antes de que un OGM sea utilizado requiere de un profundo análisis de riesgo con el objetivo de determinar potenciales riesgos a la salud humana o al medio ambiente. Previa a la salida al mercado de un OGM, se debe determinar las medidas de gestión de riesgo que se requieren adoptar para minimizar los posibles impactos adversos a la salud humana y al ambiente que pudiera ocasionar un determinado transgénico. Debido a que cada modificación genética es diferente, estos análisis deben realizarse caso por caso, gen dependiente y lugar dependiente, por lo que en el caso de los OGMs no es posible generalizar [1].

El Ecuador, a pesar de haber ratificado el Protocolo de Cartagena el 30 de enero de 2003 [2], no tiene regulaciones específicas en cuestión de Bioseguridad relacionada con organismos genéticamente modificados. El Ministerio del Ambiente ha trabajado durante años para establecer un Marco Regulatorio sobre Seguridad de la Biotecnología que hasta el momento no ha concluido [3]. En la nueva Constitución del Ecuador aprobada en 2008, en el artículo 401 se declara al país libre de semillas y cultivos transgénicos, lo que implicaría la no existencia de organismos genéticamente modificados en el territorio ecuatoriano [4]. Además existen leyes ecuatorianas donde en ciertos artículos se establecen procedimientos sobre el manejo y etiquetado de OGMs pero ninguna de ellas se cumple en la actualidad. Algunos ejemplos de esto son la ley de Defensa del Consumidor que establece que los productos derivados de OGMs deben ser etiquetados de manera resaltada [5] y la Ley Orgánica de Salud, que aclara que la Autoridad Competente del país [6] deberá coordinar con organismos especializados para 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 [7]. A pesar de

los esfuerzos e interés en la creación de una legislación sobre los organismos genéticamente modificados en el Ecuador, los artículos aislados en diferentes leyes no se cumplen y no existe un organismo real encargado del manejo de este tema en el país.

Para el cumplimiento de las regulaciones existentes y para asegurar la declaración de país libre de OGMs, es necesario contar con medios y recursos especializados para este tema y, entre ellos, la detección de organismos genéticamente modificados es uno de los procedimientos principales.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue la estandarización de una metodología para la detección y cuantificación de soya transgénica mediante PCR en tiempo real, utilizando muestras de soya en grano colectadas en distintos lugares del Ecuador.

Métodos

Material vegetal

Se colectó un total de 26 muestras de semilla de soya: 16 muestras en centros de acopio de la provincia de Los Ríos en los años 2008, 2009 y 2010; y 10 muestras de soya comercializada, adquiridas en el año 2009 en distintas ciudades del país (Tabla 1).

Soya transgénica obtenida del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina (INTA) fue usada como control positivo. Para la calibración de la curva estándar en la amplificación por PCR en tiempo real se usó Material de Referencia Certificado con diferentes fracciones (0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 %) de soya *Roundup Ready* (Evento GTS 40-3-2, línea AG5602 RR) importado desde el IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) de la Comisión Europea de la JRC (*Joint Research Centre*).

Las semillas de soya fueron lavadas con agua corriente. Una vez secas, fueron molidas usando un triturador eléctrico. Los residuos de harina de soya que quedaron adheridos en la pared del molino fueron colectados en 3 tubos eppendorf estériles después de cada molienda.

Extracción de ADN genómico y cuantificación

El ADN genómico fue extraído a partir de 3 submuestras de aproximadamente 100mg de harina de soya mediante el uso del kit *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. El ADN fue resuspendido en el buffer de elución proporcionado en el kit, mantenido a -20°C hasta ser cuantificado con un Espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific, USA).

Origen	Número de muestras	Tipo de muestra	Año de colección
Los Ríos	16	Semilla de soya	2008-2010
Guayas	5	Grano de soya	2009
Azuay	1	Grano de soya	2009
Cotopaxi	2	Grano de soya	2009
Importada	2	Grano de soya y pasta de soya	2009

Tabla 1: Muestras de semillas de soya, soya en grano y pasta de soya, origen y año de colección.

Nombre del Primer	Secuencia Diana	Secuencia del Primer	Tamaño de amplicón
P35S-F P35S-R	Promotor 35S CaMV	GAAGGTGGCTCCTACAAATGC TAGTGGGATTGTGCGTCATCC	200bp
TNOS-F TNOS-R	Terminador NOS	GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTAA TTATCCTAGGTTGCGCGCTATATTT	69bp

Tabla 2: Nombre y secuencia de los primers utilizados en esta investigación para la amplificación de P35S y TNOS, y el tamaño de amplicón respectivo [8, 9].



Figura 1: Resultados de amplificación del promotor 35S (200pb) mediante PCR en punto final en las 26 muestras de granos de soya y pasta de soya del estudio. Se observan dos muestras positivas: muestra 22 y muestra 23 (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).

Amplificación en punto final del promotor 35S y del terminador NOS

El protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollado para la amplificación 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. La mezcla de las reacciones de amplificación fue preparada en un volumen final de 10ul y contenía buffer de PCR 1X, 1.5U de Taq Polimerasa, 2mM de MgCl₂, 0.5mM de dNTPs, 0.5μM de cada primer (Invitrogen Corporation, California, USA) (Tabla 2) y 200ng de ADN genómico de soya. 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. El programa de amplificación del terminador NOS inició con desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnat-

uralización a 95°C por 1 minuto, anclaje de primers a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto; la extensión final a 72°C por 10 minutos. Además de las muestras analizadas, se usó ADN de naranjilla en la misma concentración como control negativo.

Los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % con buffer TBE 1X, teñido con SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA). Se usó el marcador de peso molecular *TrackIt 100bp* (Invitrogen, USA). Los geles fueron visualizados mediante iluminación con luz UV en el fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio-Rad, Canadá).

Detección y Cuantificación mediante la amplificación por PCR en Tiempo Real

Para la amplificación en tiempo real se usó el kit *QuantiTect SYBR Green PCR* (Qiagen, USA). La mezcla de las reacciones de amplificación fue preparada en un volumen final de 20ul con 1X de Buffer *QuantiTect SYBR Green*, que contiene las concentraciones adecuadas de MgCl₂, dNTPs, Taq polimerasa y SYBR Green, se agregó además 0.5μM de cada primer y 100ng de ADN de soya.

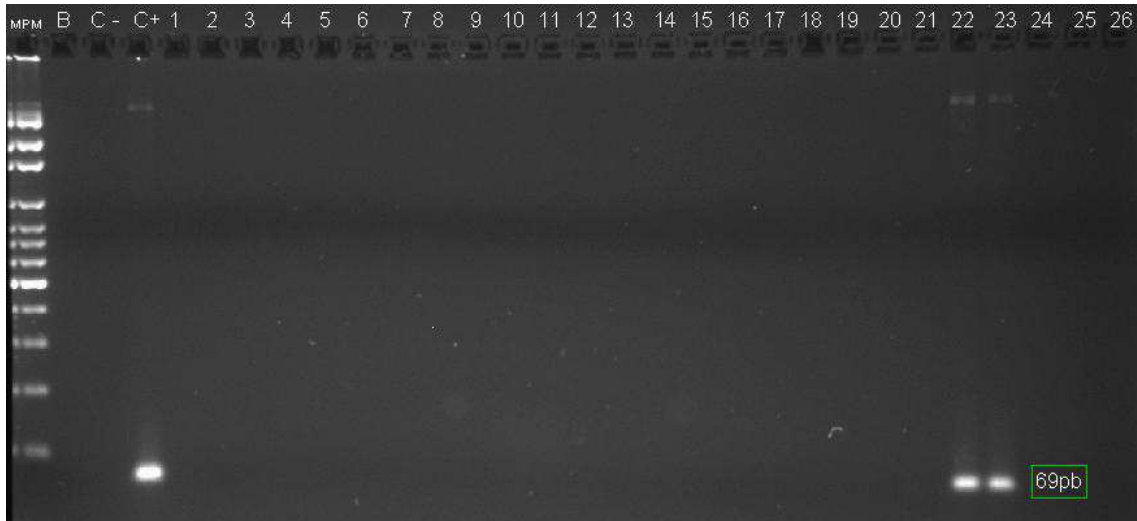


Figura 2: Resultados de amplificación del terminador NOS (69pb) mediante PCR en punto final en las 26 muestras de granos de soya y paste de soya del estudio. Se observan dos muestras positivas: muestra 22 y 23 (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).

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 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. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Además se incluyó una muestra de ADN de naranjilla como control negativo, 4 muestras por duplicado del material de referencia certificado para la calibración de la curva estándar, ADN del plásmido pBI121 como control positivo y una reacción sin ADN como control de contaminación. Los análisis incluidos en cada corrida de amplificación fueron la curva de amplificación, curva estándar, y picos de disociación. La curva estándar permite realizar la comparación de los valores *Ct* (por sus siglas en inglés *Cycle Threshold*) de las muestras analizadas con los valores *Ct* de las muestras del material de referencia certificado para determinar el contenido de OGM.

Resultados y Discusión

Obtención y preparación de muestras

Las muestras de soya procedentes de la provincia de Los Ríos son interesantes ya que corresponden a soya cultivada en el territorio ecuatoriano, a diferencia de las otras muestras que son consumidas pero no necesariamente sembradas localmente.

En el Manual de procedimientos del Laboratorio para detección de OGMs, del 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 [10]. En este estudio, las muestras no fueron colectadas personalmente por los investigadores por lo que el procedimiento de muestreo no forma parte de la metodología de este estudio. Por otro lado, para 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. Sin embargo, el principal objetivo de esta investigación fue estandarizar el protocolo de amplificación PCR para detectar la presencia o ausencia de soya transgénica en el Ecuador, por lo que la metodología de muestreo podrá implementarse en estudios posteriores.

En esta investigación se siguió la metodología propuesta en el Laboratorio de Detección de OGMs del Instituto de Biotecnología de Buenos Aires - Argentina, 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 [11]. En este estudio se procesó muestras de 1Kg de semilla de soya que equivale a aproximadamente a 4500 granos.

Detección mediante PCR en punto final

Se observó en gel de agarosa 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. Una de las muestras positivas correspondió a soya en grano comprada en un supermercado de Quito (muestra 22) y la segunda correspondió a pasta de soya importada de Argentina (muestra 23) (Figura 1 y 2).

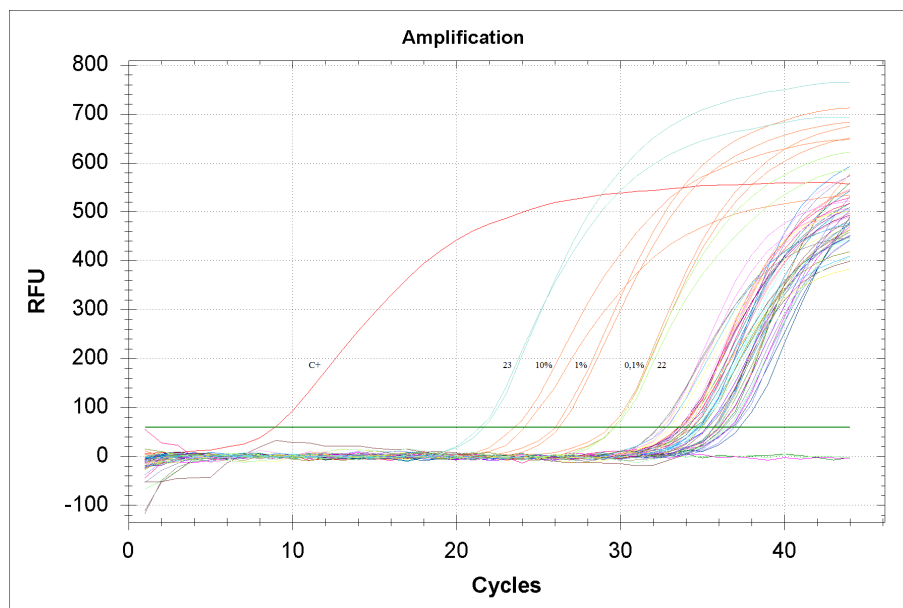


Figura 3: Curvas de amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. El control positivo, C+, muestra 23, muestras estándares 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).

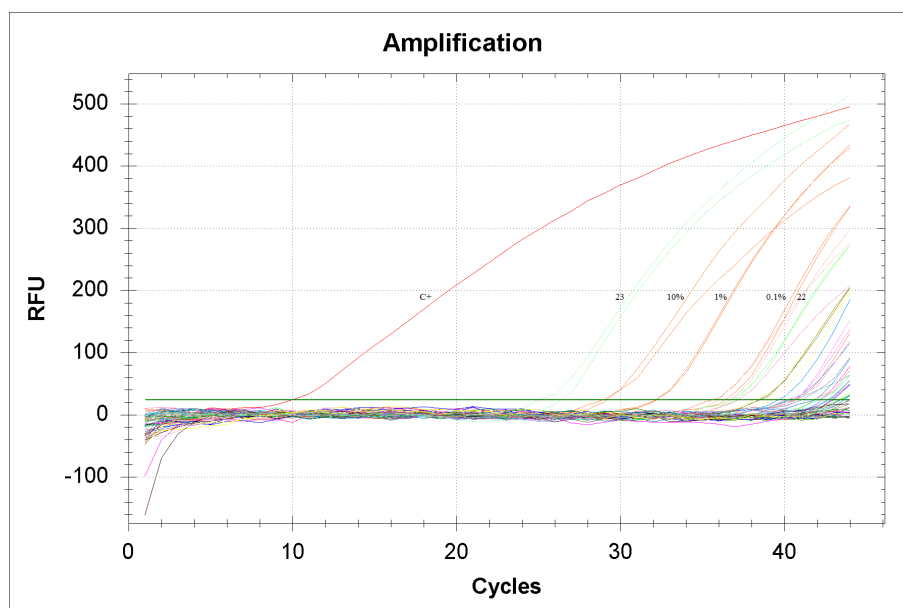


Figura 4: Curvas de amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. El control positivo, C+, muestra 23, muestras estándares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

A pesar de que esta investigación se centra únicamente en el análisis de granos de soya, se decidió incluir la muestra de pasta de soya por ser importada desde Argentina. En ese país, en el 2009 la producción biotecnológica de soya representó el 98.9 % de la producción nacional [12], por lo que la probabilidad de que la pasta de soya sea transgénica era muy alta. Los resultados de este estudio confirman 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. 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.

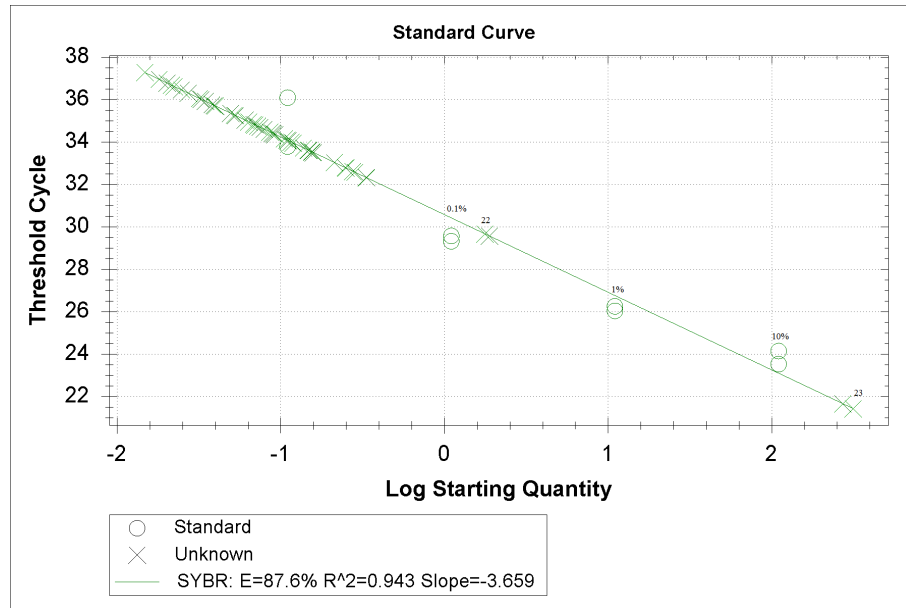


Figura 5: Curva estándar de amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 %), Las X representan a las 26 muestras por duplicado. Se señalan las muestras 22 y 23 por tener resultados positivos para la amplificación de la región de interés.

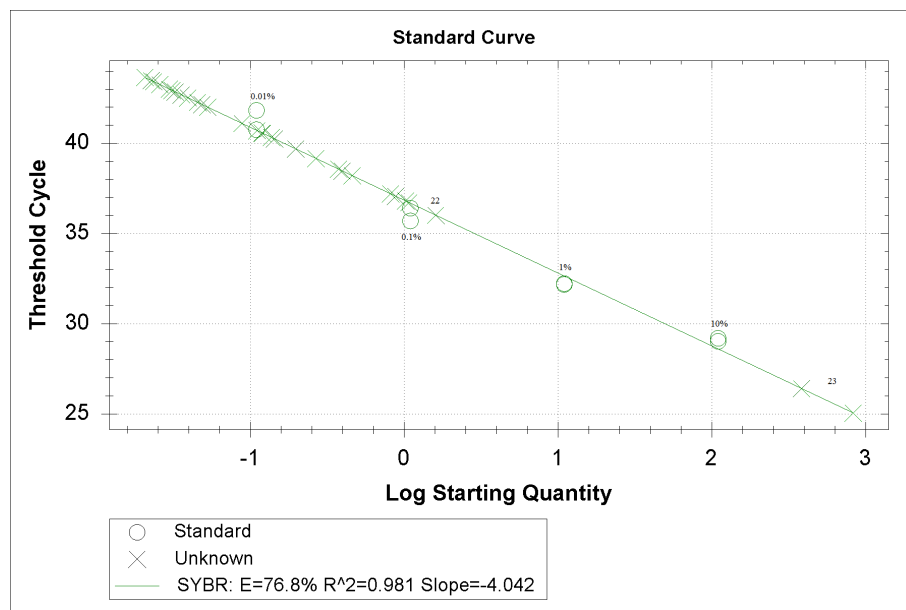


Figura 6: Curva estándar de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 %), Las X representan a las 26 muestras por duplicado. Se señalan las muestras 22 y 23 por tener resultados positivos para la amplificación de la región de interés.

Detección y Cuantificación mediante PCR en Tiempo Real

Varios estudios de análisis de OGMs se han estandarizado en PCR en punto final [8, 11, 13]. Sin embargo, 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 [14, 15]. La metodología mencionada carece de información cuantitativa exacta, por lo que la presente investigación se centra principalmente en el desarrollo de un método de detección mediante PCR en tiempo real

que permite la cuantificación del contenido de OGM en una muestra determinada.

Se estandarizó un protocolo de detección de OGMs para granos de soja mediante PCR en tiempo real utilizando las temperaturas establecidas en la amplificación mediante PCR en punto final. 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 C_t respectivos. El ciclo en el que la fluorescencia excede un umbral de detección, el C_t se correlaciona con la cantidad de producto amplificado (cantidad de ADN diana) [15]. Mientras menor es el valor de C_t , mayor es la concentración de ADN diana. La muestra 23 tiene un C_t 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 C_t (desde 23.5 hasta 29), seguidas de la muestra 22 con un C_t cerca de 30. 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” [16].

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

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).

Basándonos en la publicación de Lübeck [15], 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 (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 (Figuras 5 y 6) al comparar con los productos amplificados a partir del material de referencia certificado con los porcentajes de OGM correspondientes.

La mayoría de países en la actualidad tienen métodos de detección validados y laboratorios certificados. 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 [15].

En el presente estudio, una vez estandarizado el protocolo, se comprobó que la tecnología basada en SYBR Green permite la detección y cuantificación de las muestras positivas. Siew-Ping, Yoke-Kqueen y Son [17] 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 cantidad de muestras analizadas.

Esta investigación se basó en secuencias específicas al promotor 35S y terminador NOS 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 [18] menciona que existen 14 eventos de soya GM aprobados en distintos países, pero en la bibliografía se encuentran 10 eventos aprobados [19, 20] y no todos contienen los elementos amplificados en este estudio. 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 usando PCR en tiempo real indican 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.

Cuando un producto alimenticio es evaluado y es positivo para la presencia de OGMs, los pasos a seguir son verificar mediante PCR en tiempo real a qué evento de transformación genética 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) [8, 13]. Para que este tipo de evaluaciones puedan ser realizadas en el país, es primordial instaurar instituciones especializadas en detección de OGMs e identificación de eventos de transformación específicos.

El aporte de este trabajo fue el estandarizar una metodología para la detección y cuantificación de soya transgénica mediante PCR en tiempo real con tecnología SYBR Green. Además se determinó la presencia de soya transgénica en 2 de las 26 muestras analizadas.

El análisis de riesgo de los OGMs debe basarse en criterios técnicos y científicos coherentes, es por eso que el Ecuador debe establecer un marco regulatorio claro para el manejo de organismos genéticamente modificados. En este contexto, y considerando las regulaciones vigentes en el país, este marco debe contar con los procedimientos adecuados e internacionalmente validados para detectar, identificar y cuantificar organismos genéticamente modificados en cultivos y alimentos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador) por el financiamiento de esta investigación (Small Grants Program 2008), y a la Dra. Lewi del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina por el envío de la muestra molida de soja transgénica para ser usada como control positivo en este estudio. Agradecen también a Bernardo Gutiérrez por la revisión del presente manuscrito.

Referencias

- [1] Villalobos, V. 2008. "Los Transgénicos: Oportunidades y amenazas". *Mundi-Prensa: D.F.*
- [2] Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2011. "Partes en el Protocolo. Situación de Ratificación y Entrada en vigencia". *Enlace: <http://bch.cbd.int/protocol/parties/>, Biosafety Clearing House: Montreal, Fecha de Consulta: 8 mayo 2011.*
- [3] Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2009. "Experto en la Seguridad de la Biotecnología". *Enlace: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=100158>, Biosafety Clearing-House : Montreal, Fecha de Consulta: 11 mayo 2011.*
- [4] Congreso Nacional. 2008. "Constitución del Ecuador". *Enlace: http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf, Asamblea Constituyente: Quito, Fecha de Consulta: 9 julio 2009.*
- [5] Congreso Nacional. 2000. "Ley Orgánica de Defensa del Consumidor (Ley No. 2000-21)". *Enlace: http://www.micip.gov.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=458&Itemid=135, Ministerio de Industrias y Productividad: Quito, Fecha de Consulta: 20 abril 2011.*
- [6] Congreso Nacional. 1999. "Ley de Gestión Ambiental". *Enlace: <http://www.conelec.gob.ec/images/documentos/LEY%20DE%20GESTION%20AMBIENTAL.doc>, Consejo Nacional de la Electricidad: Quito, Fecha de Consulta: 25 abril 2011.*
- [7] Congreso Nacional. 2006. "Ley Orgánica de Salud". *Enlace: http://www.bioetica.org.ec/c_ley_salud.pdf, Bioética.org: Quito, Fecha de Consulta: 20 mayo 2011.*
- [8] Tozzini, A.; Martínez, C.; Lucca, F.; Vázquez, C.; Distéfano, A.; del Vas, M.; Hoop, E. 2000. "Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification". *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(2): <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v3n2/art08.pdf>.
- [9] Barbau-Piednoir, E.; Lievens, A.; Mbongolo-Mbella, G.; Roosens, N.; Sneyers, M.; Leunda-Casi, A.; Van den Bulcke, M. 2010. "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*, 230:383 – 393.
- [10] Álvarez, E.; Castellanos, J.; Maldonado, C. 2007. "Manual de procedimientos de laboratorios para detección de organismos genéticamente modificados". *Enlace: http://www.bch.org.co/bioseguridad/doc/Manual_LaboratorioOGM.pdf, Instituto de Investigaciones de Recursos Bibliográficos Alexander Von Humboldt: Bogotá, Fecha de Consulta: 24 abril 2011.*
- [11] INTA. 2002. "Análisis de Detección de Organismos Genéticamente Modificados". *Enlace: http://www.inta.gov.ar/biotec/servicios/deteccion_ogm.htm, Laboratorio de Detección de OGMs. Instituto de Biotecnología: Buenos Aires, Fecha de Consulta: 26 marzo 2011.*
- [12] The American Soybean Association. 2010. "World Statistics. Adoption of Biotech-enhanced Soybean Seedstock 1997-2009". *Enlace: <http://www.soystats.com/2010/Default-frames.htm>, Soy Stats: Saint Louis, Fecha de Consulta: 21 septiembre 2010.*
- [13] Tengel, C.; Scüßler, P.; Setzke, E.; Balles, J.; Sprenger-Haußels, M. "PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs". *BioTechniques*, 31:426 – 429.
- [14] Weighardt, F. "Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión 10. PCR Cuantitativa para la Detección de OGM". *Enlace: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n10.pdf>, Joint Research Center. Institute for Health and Consumer Protection, Fecha de Consulta: 26 marzo 2011.*
- [15] Lübeck, M. "Detection of genetically modified plants - methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products". *Enlace: <http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm>, Skov- og Naturstyrelsen, Fecha de Consulta: 17 marzo 2011.*
- [16] Teichert, S.; André, M. 2009. "Límites de Tolerancia para Semillas Adventicias". *Enlace: http://www.seednews.inf.br/_html/site_es/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=39, SeedNews: Pelotas, Fecha de Consulta: 26 abril 2011.*
- [17] Siew-Ping, K.; Yoke-Kqueen, C.; Son, R. 2011. "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*, 18:507 – 514.
- [18] James, C. 2010. "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010". *Enlace: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.asp>, ISAAA: Ithaca, Fecha de Consulta: 11 noviembre 2010.*
- [19] Joint Research Centre. 2010. "Status of Dossiers". *Enlace: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>, European Commission Joint Research Centre. European Union Reference Laboratories of GM Food and Feed, Fecha de Consulta: 20 septiembre 2010.*

- [20] ILSI. "Listing of Query Results. Soybean". *Enlace: http://ceragmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=Submit&hstID_XCode=8*. Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database, Fecha de Enlace: 20 abril 2011.