



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

Diseño y fabricación de un arreglo molecular de ADN para  
la identificación de regiones promotoras y terminadoras  
utilizadas en la construcción de organismos genéticamente  
modificados

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

**Carolina Garciglia Mercado**

La Paz, Baja California Sur, Octubre de 2014

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 11:00 horas del día 31 del mes de octubre del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**“Diseño y fabricación de un arreglo molecular de ADN para la identificación de regiones promotoras y terminadoras utilizadas en la construcción de Organismos Genéticamente Modificados”**

Presentada por la alumna:


Carolina Garciglia Mercado

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biología.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

\* LA COMISIÓN REVISORA

  
Dra. Gracia María Gómez Anduro  
DIRECTORA DE TESIS

  
Dr. Jorge Ramírez Salcedo  
CO-TUTOR

  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
CO-TUTOR

  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Directora de Tesis:**

**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.**

### **Co-tutor:**

**Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.**

### **Co-tutor:**

**Dr. Jorge Ramírez Salcedo  
Universidad Nacional Autónoma de México**

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Jorge Ramírez Salcedo**

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Jorge Ramírez Salcedo**

### **Suplente**

**Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez**

## RESUMEN

Desde que los primeros cultivos de soya y canola resistentes a herbicidas fueron cultivados comercialmente en 1996, los cultivos de Organismos Genéticamente Modificados (OGM's) se han expandido a aproximadamente 175.2 millones de hectáreas en 27 países, por lo que muchos países y federaciones han implementado sistemas de seguridad y vigilancia. Sin embargo, aunque la complejidad y la variabilidad de los OGM's se encuentran en aumento, con frecuencia su detección se enfoca en la búsqueda de un limitado número de elementos genéticos. En particular, las herramientas para su detección se basan en la búsqueda del promotor CaMV35s (derivado del virus del mosaico de la coliflor) o la combinación de CaMV35s y el terminador Nos (del gen de la Nopalina Sintetasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*). No obstante, el 38% de los transgénicos no son detectados con solo una prueba para CaMV35s, y la combinación de CaMV35s y Nos disminuye esta tasa de falsos negativos a un 28%. Además, estas herramientas tienen la desventaja de ser funcionales en la medida que se conozca el gen introducido como transgen y que se utilicen las construcciones habituales. Por lo cual, se desarrolló una técnica eficaz que permite identificar un mayor número de elementos transgénicos en un cultivo o producto, sin la necesidad de conocer previamente el origen del transgen. El objetivo general de este trabajo fue: diseñar y fabricar un arreglo molecular para la identificación de regiones promotoras y terminadoras comúnmente utilizadas en la construcción de organismos genéticamente modificados. El diseño de sondas a partir de secuencias derivadas de un análisis bioinformático de las regiones promotoras y terminadoras de los genomas existentes en las bases de datos, de construcciones comerciales de vectores de expresión y de construcciones experimentales, permitió el diseño de un arreglo molecular de ADN con 45 sondas capaces de identificar la presencia de elementos transgénicos. Un total de 33 sondas resultaron efectivas en la hibridación de los microarreglos acoplado a la técnica de PCR multiplex, permitiendo una aproximación rápida para la detección simultánea de elementos transgénicos en productos frescos y procesados. Así, mediante ésta herramienta se identificaron 4 granos y 2 harinas tomadas de comercios locales, que contienen elementos transgénicos (7s, P-SAMS, tahsp17) y se identificaron elementos transgénicos “no declarados” en algunas de las construcciones de patente. Por lo tanto, el diseño del arreglo molecular de ADN para la identificación de transgénicos presenta la ventaja de poder incorporar eventualmente sondas que permitan mantenerlo actualizado para la identificación de nuevas variedades transgénicas apoyando el desarrollo de técnicas para el monitoreo y control de transgénicos.

**Palabras claves:** Arreglo molecular, regiones promotoras y terminadoras, sonda, PCR multiplex, transgénico, 7s, P-SAMS, tahsp17.

---

Vo. Bo.

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

## ABSTRACT

Since the first herbicide-resistant soybean and canola were grown commercially in 1996, cultivation of Genetically Modified Organisms (GMOs) have expanded approximately to 175.2 million hectares in 27 countries, which is why many countries and federations have implemented security and monitoring systems. Although complexity and variability of GMOs are increasing, their detection focuses on searching for a limited number of genetic elements. Specifically, the tools for their detection are based on the search of CaMV35S promoter (deriving from the cauliflower mosaic virus) or the combination of both CaMV35s and the nopaline synthase (nos) gene terminator of *Agrobacterium tumefaciens*. However, 38% of GMOs are not detected with only the CaMV35s test, and the combination of CaMV35s and nos decreases this false negative rate to 28%. Moreover, these tools have the disadvantage of being functional as long as the gene introduced as a transgene is known and the usual constructions are used. Therefore, we developed an effective technique to identify a larger number of elements in a GM crop or product without prior knowledge of the transgene. The overall objective of this study was to design and manufacture a molecular based method for identifying the promoter and terminator regions commonly used in the construction of GMOs. Probe design starting from sequences of a bioinformatics analysis of promoter and terminator regions of the existing genomes in the databases, commercial construction of expression vectors, and experimental constructions allowed the design of a DNA molecular array with 45 probes capable of identifying the presence of transgenic elements. A total of 33 probes were effective with the microarray coupled with the multiplex PCR system, allowing a fast approach for the simultaneous detection of transgenic elements in fresh and processed products. Through this tool 4 grains and 2 types of flour taken from local businesses were identified containing transgenic elements (7s, P-SAMS, tahsp17) and also "undeclared" transgenic elements in some of the construction patents. Therefore, the design of the DNA molecular arrangement for GM identification has the advantage of being able to eventually incorporate more probes allowing to keep the identification of new transgenic varieties updated and support the development of techniques for GM monitoring and control.

Key words: molecular array, promoter and terminator regions, probe, multiplex PCR, transgenic, 7s, P-SAMS, tahsp17.

**DEDICATORIA**

**A mi Madre**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada () que permitió el desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme realizar mis estudios de posgrado nivel maestría. En especial quiero agradecer a su personal administrativo y de posgrado, por su amabilidad y todas las facilidades que me brindaron para realizar mis estudios de maestría.

A la Maestra Diana Dorantes, por su apoyo en la edición del resumen en inglés de este Documento de tesis.

A mi mentora, la Dra. Gracia Gómez Anduro por su interminable guía, apoyo, paciencia y valiosos consejos para la realización de este proyecto, no terminaré de agradecerle. A mis co-tutores, Dr. Jorge Ramírez Salcedo, por las importantes aportaciones y consejos que amablemente me brindo para el desarrollo de este trabajo; también al Dr. Felipe Ascencio Valle por siempre estar en disposición de apoyarme y aconsejarme.

A los laboratorios de Patogénesis Microbiana y Biología Molecular de Plantas, por las facilidades prestadas y su personal técnico responsable (Dra. Martha Reyes Becerril y M.C. Julio Hernández).

A la Unidad de Microarreglos de ADN de la UNAM y su personal técnico: José Luis, Simón y muy especialmente a Lorena, quien me adiestro, apoyo y aconsejo durante toda mi estancia en la unidad.

Al M.C. Mario Rojas Arzaluz por ser un verdadero Maestro en toda la extensión de la palabra, aconsejarme y apoyarme.

Al Dr. Raúl Llera mi mentor bioinformático, por su gran paciencia y sus valiosos consejos durante el desarrollo de mi tesis.

Al técnico Delia Rojas del laboratorio de Genética Molecular, por las innumerables ocasiones que me recibió con las puertas abiertas y me brindó su apoyo y consejo.

A mis compañeras de laboratorio, Erika, Bety, Yle, Rubi, Anais y Cristal.

A mis compañeros y casi hermanos Karina, Marcelo, Patricia, Raziél y Héctor, por siempre estar ahí en los días buenos y malos, y a mi motivador personal, gracias Iván.

Finalmente a mi familia y amigos por ser mi apoyo y soporte.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>vi</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>vii</b>
<b>Indice de figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Indice de tablas</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
2.1 Organismos Genéticamente Modificados.....	<b>1</b>
2.1.1 Distribución mundial.....	<b>3</b>
2.2 Bioseguridad.....	<b>7</b>
2.3 Detección de OGM's.....	<b>11</b>
2.4 Tecnologías de microarreglos desarrolladas en los últimos años.....	<b>13</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
5.1 Objetivo general.....	<b>16</b>
5.2 Objetivos específicos.....	<b>16</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
6.1 Muestras.....	<b>16</b>
6.1.1 Extracción de ADN.....	<b>17</b>
6.2 Análisis y selección de secuencias para diseño de sondas.....	<b>18</b>
6.3 Criterios para el diseño de sondas.....	<b>18</b>
6.4 Diseño de cebadores.....	<b>19</b>
6.5 Estandarización de amplificación individual.....	<b>19</b>
6.6 Validación del arreglo.....	<b>20</b>
6.7 Amplificación y marcado de las muestras de cultivos o productos.....	<b>22</b>
6.8 Impresión del arreglo de ADN.....	<b>22</b>
6.9 Hibridización con adn genómico de las muestras de cultivos o productos.....	<b>23</b>
6.9.1 Pretratamiento del arreglo.....	<b>23</b>
6.9.2 Hibridación.....	<b>23</b>
6.10 Lectura del arreglo en scanner.....	<b>23</b>
6.11 Validación por secuenciación de los elementos detectados en el arreglo.....	<b>23</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
7.1 Cuantificación y calidad del ADN.....	<b>25</b>
7.2 Análisis y selección de secuencias para diseño de sondas.....	<b>27</b>
7.3 Diseño de sondas.....	<b>27</b>
7.4 Diseño de cebadores.....	<b>27</b>
7.5 Estandarización de amplificación individual.....	<b>28</b>
7.6 Amplificación y marcado de las muestras de cultivos o productos.....	<b>31</b>
7.7 Hibridización con adn genómico de las muestras de cultivos o productos.....	<b>31</b>



7.8 Identificación de elementos endógenos y transgénicos en muestras control, germinados de semillas y productos procesados.....	32
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
8.1 Extracción de ADN .....	38
8.2 Diseño de sondas y cebadores .....	38
8.3 Hibridación del arreglo .....	39
8.4 Validación del arreglo molecular .....	41
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>45</b>

**INDICE DE FIGURAS.**

<b>Tabla I.</b> Mayores productores de cultivos genéticamente modificados en el mundo (modificado de James, 2013; Khan <i>et al.</i> , 2012). .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Gel de electroforesis de agarosa al 1% de ADN de harinas.....	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b> Gel de electroforesis de agarosa al 1% de ADN de muestras de semillas y controles positivos de transformación del laboratorio de Biología Molecular de Plantas....	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Amplificación de elementos endógenos de maíz y trigo.....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Amplificación de elementos endógenos de Soya.....	<b>29</b>
<b>Figura 6.</b> Amplificación de elementos endógenos de Arroz.....	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b> Amplicones de controles positivos de transformación genética proporcionados por SENASICA.....	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> Perfil de amplificación por PCR multiplex de diversos templados. ....	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> Laminilla impresa por Microarray en la cámara de hibridación humidificada. ...	<b>32</b>
<b>Figura 10.</b> Hibridación de las laminillas.....	<b>33</b>

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla I.</b> Mayores productores de cultivos genéticamente modificados en el mundo (modificado de James, 2013; Khan <i>et al.</i> , 2012). .....	<b>5</b>
<b>Tabla II.</b> Países con el mayor número de eventos aprobados en el mundo modificado de James, 2013). .....	<b>6</b>
<b>Tabla III.</b> Cultivos y alimentos que han sido objeto de modificación genética (modificado de James, 2013). .....	<b>6</b>
<b>Tabla IV.</b> Reglamentos sobre bioseguridad en América Latina (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2010; Katovich, 2012). .....	<b>10</b>
<b>Tabla V.</b> Mezcla de reacción de PCR punto final para estandarización de amplificación .....	<b>20</b>
<b>Tabla VI.</b> Materiales de Referencia de construcciones transgénicas. ....	<b>21</b>
<b>Tabla VII.</b> Mezcla de reacción para PCR multiplex. ....	<b>22</b>
<b>Tabla VIII.</b> Mezcla para hibridación .....	<b>23</b>
<b>Tabla IX.</b> Mezcla de reacción de PCR punto final para validación de elementos detectados. ....	<b>24</b>
<b>Tabla X.</b> Cuantificación de ADN de muestras de alimentos procesados, germinados de semillas y controles positivos de transformación genética. ....	<b>26</b>
<b>Tabla XI.</b> Verificación de amplicones detectados por secuenciación. ....	<b>30</b>
<b>Tabla XII.</b> Detección de elementos transgénicos por hibridación en la laminilla A. ....	<b>34</b>
<b>Tabla XIII.</b> Detección de elementos transgénicos por hibridación en la laminilla B. ....	<b>35</b>
<b>Tabla XIV.</b> Detección de elementos transgénicos por hibridación en la laminilla C conteniendo controles positivos proporcionados por SENASICA. ....	<b>36</b>
<b>Tabla XV.</b> Identificación por medio de secuenciación y BLAST (NCBI) de elementos transgénicos en muestras presentas en las laminillas A, B y C. ....	<b>37</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

Aunque la complejidad y la variabilidad de los Organismos genéticamente modificados (OGMs) se encuentran en aumento, con frecuencia su detección se enfoca en la búsqueda de un limitado número de elementos genéticos. En particular, los laboratorios privados de análisis de OGMs y de productos transgénicos, ofrecen únicamente la prueba para el promotor CaMV35s (derivado del virus del mosaico de la coliflor) o para la combinación de CaMV35s y el terminador Nos (del gen de la Nopalina Sintetasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*). CaMV35s es uno de los elementos genéticos más ampliamente utilizados en las modificaciones genéticas en plantas, su presencia es usada como una aproximación para identificar vectores de clonación y otras construcciones que pudieran ser relevantes para la transformación de las plantas (Tengs *et al.*, 2007). Sin embargo, el 38% de los transgénicos no son detectados con solo una prueba para CaMV35s. La combinación de CaMV35s y Nos disminuye esta tasa de falsos negativos a un 28% (Von Götz, 2010). Por lo tanto, una búsqueda extensa para la detección de transgénicos basada solo en estos elementos genéticos generaría resultados deficientes.

Reconociendo el poder de los microarreglos para la detección de transgénicos, muchos grupos científicos trabajan en el desarrollo de sus propios protocolos.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Organismos genéticamente modificados**

Los genes son secuencias de ADN que contienen la información necesaria para afectar la expresión fenotípica de un organismo, tales como la forma de una semilla o resistencia a una plaga específica. La información codificada por el gen se expresa a través de dos pasos principales: la transcripción, en la cual la región codificante del ADN se copia a ARN de cadena sencilla y la traducción, en donde la secuencia de aminoácidos codificada por el ARNm se ensambla y se traduce en proteína (Lino-Ferreira, 2010; Karakach *et al.*, 2010).

Un organismo genéticamente modificado es todo organismo vivo que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la

biotecnología moderna (LBOGM 2005; Protocolo de Cartagena Sobre Seguridad de la Biotecnología, 2000). Esta nueva tecnología permite la inserción de uno o más genes en el genoma de un organismo a partir de un organismo o especie diferente (animales, plantas, virus, bacterias), la expresión del gen da lugar a una nueva función introducida en el fenotipo del organismo modificado. Así, para la creación de un organismo modificado genéticamente, es necesario introducir el gen responsable de un rasgo en particular en el genoma del organismo deseado a través de técnicas de ADN recombinante.

Un inserto típico o construcción en un transgénico está compuesto de tres elementos; un elemento promotor que funciona como un interruptor del gen insertado o alterado, el gen de interés o transgen que codifica para una característica específica seleccionada y un elemento terminador que funciona como una señal de terminación del gen insertado o alterado (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática del tipo de construcción empleada para la obtención de OGMs (modificado de Von Götzt, 2010).

El promotor es el elemento que controla cuándo y dónde se expresará el gen en la planta. Los promotores pueden ser clasificados en tres categorías: constitutivos, tejido específico e inducibles. La mayoría de los promotores en las variedades de cultivos transgénicos son constitutivos, es decir, causan la expresión del gen durante todo el ciclo biológico de la planta en la mayoría de los tejidos. El promotor constitutivo usado más comúnmente es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, cuyo nombre a menudo se abrevia como promotor CaMV o 35S (Powell, 1999). Éste promotor se obtuvo del virus que causa la enfermedad del mosaico de la coliflor en varias hortalizas, como la coliflor, el brócoli, la

col y la canola. Los promotores de tejido específico expresan el gen únicamente en un tipo de tejido y pueden o no causar la expresión del gen durante todo el ciclo biológico de la planta, mientras que los promotores inducibles solo inician la expresión del gen bajo ciertas condiciones externas, como la intensidad de la luz, temperatura, niveles nutricionales o en respuesta a una sustancia química en particular.

Para incrementar la actividad de expresión de los promotores se han realizado varias modificaciones de la construcción transgénica, como la duplicación de regiones amplificadoras de los promotores y la inserción de intrones provenientes de otros promotores. El intrón es generalmente insertado entre el promotor CaMV35s y el codón inicial de la región codificante del transgen. Algunos intrones que han sido probados incluyen los provenientes de los genes *Adh1*, *Sh1*, *Ubi1* y *Act1* del maíz y del gen *Chs* de petunia (Dong Liu, 2009).

El gen de interés o transgen le conferirá al organismo resistencia a antibióticos, herbicidas o nematodos, como la expresión de la proteína modificada Cry1Ab la cual es tóxica para los lepidópteros permitiendo a la planta resistir a ataques por estos insectos, la expresión de las enzimas PAT (fosfinotricina acetil transferasa) o EPSPS (5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa) para conferirles tolerancia al herbicida glufosinato de amonio o glifosato, respectivamente, entre muchas otras características.

Por último, la terminación de la transcripción se determina por una secuencia de terminación, que está situada río abajo del sitio de terminación de la traducción. El elemento terminador más utilizado es tNOS del gen de la Nopalina Sintetasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que termina la transcripción y dirige la poliadenilación.

### **2.1.1 Distribución mundial**

Desde que los primeros cultivos de soya y canola resistentes a herbicidas fueron cultivados comercialmente en 1996, los cultivos de organismos genéticamente modificados se han expandido a aproximadamente 175.2 millones de hectáreas en 27 países en los cinco continentes. En el 2013, de 107 millones de hectáreas de soya plantada mundialmente, el

79% (84.5 millones de hectáreas) es genéticamente modificada, seguida por el algodón con 23.9 millones de hectáreas, correspondientes al 70% de 34 millones de hectáreas globales, en cuanto al cultivo de maíz, de 177 millones de hectáreas mundiales el 32% (57.4 millones de hectáreas) corresponde al cultivo de genéticamente modificado y finalmente la canola tolerante a herbicida ocupa 8.2 millones de hectáreas, correspondiente al 24% de los 34 millones de hectáreas cultivadas mundialmente (James, 2013).

Desde 1994, 36 países han concedido aprobaciones regulatorias para cultivos genéticamente modificados destinados para consumo humano y/o animal y para liberación ambiental o plantación desde 1994. Un total de 2,833 aprobaciones regulatorias incluyendo 27 cultivos genéticamente modificados y 336 eventos han sido expedidas por las autoridades competentes, de los cuales 1,321 son destinados para consumo humano (directo o para procesamiento), 918 para consumo animal (directo o procesado) y 599 para liberación ambiental o plantación. Los líderes mundiales productores de cultivos genéticamente modificados incluyen Estados Unidos, Brasil, Argentina, India, Canadá y China, México ocupa el lugar diecisieteavo (James, 2013) (Tabla I). Japón tiene el mayor número de eventos aprobados, seguido por Estados Unidos, Canadá, México y Corea del Sur (Tabla II). En cuanto a los cultivos, el maíz tiene el mayor número de eventos aprobados (130 eventos en 27 países), seguido por el algodón (46 eventos en 22 países), papa (31 eventos en 10 países, canola (30 eventos en 12 países) y la soya (27 eventos en 26 países). Otros cultivos genéticamente modificados para pruebas de campo incluyen: tomate, papa, trigo, nabo, pepino, melón, alfalfa, lechuga, girasol, arroz y tabaco (Tuteja et al., 2012). Los principales cultivos y alimentos transgénicos se presentan en la Tabla III.

**Tabla I.** Mayores productores de cultivos genéticamente modificados en el mundo (modificado de James, 2013; Khan *et al.*, 2012).

<b>Orden</b>	<b>País</b>	<b>Área (millones de hectáreas)</b>	<b>Cultivos transgénicos</b>
1ro	Estados Unidos	70.1	Soya, maíz, algodón, canola, calabacín, papaya, alfalfa y remolacha azucarera
2do	Brasil	40.3	Soya, maíz y algodón
3ro	Argentina	24.4	Soya, maíz y algodón
4to	India	11.0	Algodón
5to	Canadá	10.8	Canola, maíz, soya y remolacha azucarera
6to	China	4.2	Algodón, tomate, petunia, papaya y chile morrón
7mo	Paraguay	3.6	Soya, maíz y algodón
8vo	África del sur	2.9	Maíz, soya y algodón
9no	Pakistán	2.8	Algodón
10mo	Uruguay	1.5	Soya y maíz

En la mayoría de los casos las tecnologías de los transgénicos están patentadas, desarrolladas por el sector privado y lanzadas para la producción comercial a través de acuerdos de licencia. La plantación y la producción comercial de transgénicos requieren una gran inversión, debido al alto costo de las semillas y de la tecnología necesaria. Sin embargo, su cultivo ha aumentado, principalmente a causa de los beneficios derivados por el menor empleo de mano de obra, menores costos de producción y reducción en el uso de insumos químicos, resultando en una mayor producción y por ende una mayor ganancia económica.



**Tabla II.** Países con el mayor número de eventos aprobados en el mundo (modificado de James, 2013).

<b>País</b>	<b>Número de eventos aprobados</b>
Japón	198
Estados Unidos	165
Canadá	(sin incluir eventos apilados)
México	146
Korea del Sur	131
Australia	103
Nueva Zelanda	93
Unión Europea	83
Filipinas	71
Taiwán	68
Colombia	65
China	59
África del sur	55
	52

**Tabla III.** Cultivos y alimentos que han sido objeto de modificación genética (modificado de James, 2013).

<b>Cultivos genéticamente modificados</b>		
Alfalfa	Lino	Álamo
Canola Argentina	Maíz	Soya
Clavel	Melón	Papa
Achicoria	Papaya	Arroz
Algodón	Petunia	Rosas
Césped	Ciruela	Calabacín
Caña	Pimiento morrón	Tabaco
Tomate	Trigo	

## 2.2 Bioseguridad

La aparición de la ingeniería genética en la década de 1970 en California, Estados Unidos, con el aislamiento, introducción y expresión del gen de insulina en *Escherichia coli* provocó una fuerte reacción de la comunidad científica de todo el mundo, lo que llevó a la conferencia Asilomar de ADN recombinante en 1975. En ese momento, la comunidad científica propuso un aplazamiento para la aplicación de la ingeniería genética, declarando que debían establecerse normas y garantías para asegurar el uso de las técnicas de ingeniería genética sin poner en riesgo la vida humana y el medio ambiente. Sin embargo, el aumento de la producción de los cultivos transgénicos en las últimas décadas ha despertado una serie de preocupaciones con respecto a la seguridad alimentaria, los efectos ambientales y los problemas socio-económicos (Lino-Ferreira, 2010).

Desde la perspectiva de los alimentos y la salud, las principales preocupaciones están relacionadas a la posible toxicidad y alergenicidad de los alimentos y productos transgénicos. Las preocupaciones acerca de los riesgos ambientales incluyen el impacto de la introgresión de los transgenes en el paisaje natural, el impacto del flujo de genes, efectos sobre otros organismos, evolución de la resistencia a plagas y pérdida de la biodiversidad (Tuteja *et al.*, 2012).

La adopción de tecnologías de modificación genética también evoca una serie de preocupaciones sociales y éticas sobre la restricción de acceso a los recursos genéticos y las nuevas tecnologías, el monopolio del sector privado y la pérdida de ingresos de los agricultores rurales. La evidencia científica sobre los impactos ambientales y sanitarios de los transgénicos es aún incipiente, por lo que hasta el momento no hay información concluyente sobre los efectos negativos de los transgénicos sobre la salud o el medio ambiente. Debido a esto, la percepción del público sobre los transgénicos para la alimentación y la agricultura se divide con una tendencia a evitar los alimentos transgénicos, sus productos en muchos países desarrollados y los países en desarrollo. Por lo tanto, para asegurar la generación apropiada y la utilización de esta tecnología, se han desarrollado regulaciones de bioseguridad, reglamentos y mecanismos de vigilancia en diferentes países alrededor del mundo (Lino-Ferreira, 2010).

Generalmente la seguridad se evalúa por el productor de los nuevos cultivos genéticamente modificados y luego es revisada por una autoridad independiente como la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos. El siguiente paso es el seguimiento del contenido de construcciones transgénicas en los alimentos y semillas utilizando el análisis de transgénicos. En cada país, sólo los eventos transgénicos autorizados pueden ser cultivados o empleados para su consumo y/o proceso. Debido a que la aprobación a nivel mundial de los OGMs es asincrónica, ya que diversos países o regiones permiten diferentes casos de OGMs o simplemente no tienen ninguna regulación, esto puede aumentar la posibilidad de la aparición de OGMs en regiones donde no están autorizados, por lo que los consumidores de países con una economía de libre mercado deben estar informados si sus alimentos son transgénicos. De esta manera, el etiquetado de productos transgénicos y su trazabilidad a lo largo de la cadena de valor deberían ser obligatorios.

Algunos países ya han establecido un límite permitido de 0.9 a 5%, del contenido de OGMs en los productos para consumo humano, mientras que otros países aún no han definido un criterio (Ramessar, 2008). Estados Unidos posee una de las regulaciones más estrictas con un límite de 0.9% para el contenido de OGMs autorizados y 0% de tolerancia para OGMs no autorizados, es decir, si el contenido de materias primas genéticamente modificadas empleadas para la elaboración de un producto, es por encima de 0.9%, este debe ser etiquetado, sin embargo la FDA no ha aprobado dichos criterios (US Department of Agriculture, 2008).

Para los países que conforman la Unión Europea, existen tres regulaciones que gobiernan el etiquetado de alimentos e ingredientes derivados de OGMs y que son aplicables en todos los Estados Miembros. Según *GeneScan USA* (2002) los productos deben etiquetarse como "conteniendo organismos genéticamente modificados" si al menos se establecen en alguno de los dos criterios propuestos por la Comisión Europea (Commission Regulation No. 49/2000). Esta regulación se aplica en alimentos destinados al consumo humano y fabricados, total o parcialmente, a partir de soya o maíz modificado genéticamente (European Parliament and Council, 2003).

En cuanto a países en desarrollo como los que pertenecen a América Latina, la alta capacidad técnica y jurídica requerida para mantener una regulación política es deficiente,

por lo tanto, los OGM's entran en el mercado sin importar la opinión del consumidor o el productor. Algunos detalles de las legislaciones sobre bioseguridad en estos países se muestran en la Tabla IV.

En México, la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) fue expedida en marzo del 2005, sin embargo, esta no regula un criterio límite para su etiquetado, solo establece que los transgénicos o productos que los contengan, deberán garantizar la referencia explícita de transgénicos y señalar en la etiqueta la información de su composición alimenticia o sus propiedades nutrimentales, en aquellos casos en que dichas características sean significativamente diferentes respecto de los productos convencionales (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, 2005).

Ante la creciente demanda para la detección de OGMs, la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) instruyó en el 2008 que fuera conformada una Red Nacional de Laboratorios de Detección Identificación y Cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados (RNLD-OGM), constituido por el personal designado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Secretaría de Salud (SSA), Secretaría de Economía y la Secretaría Ejecutiva de la CIBIOGEM.

En el año 2010 se instauró el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) del SENASICA, para la detección, identificación y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados de especies vegetales, animales, acuícolas y microorganismos, relacionadas con la utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto y liberación comercial.

Así mismo, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) realiza la evaluación caso por caso de los estudios que elaboran y presentan los interesados sobre inocuidad y los posibles riesgos de los Organismos genéticamente Modificados sujetos a Autorización en los términos de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, si se determina que no hay evidencia de riesgos a la salud, se emite "La Autorización para Comercialización e Importación para su Comercialización de

Organismos Genéticamente Modificados”. Y finalmente, se publica su resolución en la lista de OGMs.

**Tabla IV.** Reglamentos sobre bioseguridad en América Latina (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2010; Katovich, 2012).

<b>País</b>	<b>Regulaciones sobre Bioseguridad</b>	<b>Organizaciones Responsables</b>	<b>Situación del protocolo de Cartagena</b>	<b>Requerimientos de etiquetado</b>
Chile	Lineamientos Fitosanitarios 3557	Comité Consultivo para la Liberación de Organismos Transgénicos (CALT)	Firmado	No se han establecido límites de etiquetado para productos importados o producidos localmente.
Brasil	Ley de bioseguridad 111/2005	Comité técnico nacional de bioseguridad (CTNBio)	Ratificado	Límite de tolerancia de 1% para alimentos destinados al consumo humano o animal que contengan o hayan sido elaborados con organismos genéticamente modificados. Sin embargo, no ha sido implementado.
Argentina	Sistema formalizado de aprobación para OGM's	Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)	Firmado	No han sido establecidos
Uruguay	Decreto 353/008	Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio) Comisión de gestión del riesgo (CGR) Evaluación del riesgo en bioseguridad( ERB) Comité de articulación institucional (CAI)	No ha sido firmado	Se estableció etiquetado voluntario
Paraguay	Decreto 12.706	Comisión de Bioseguridad Agropecuaria y Forestal (COMBio) Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE)	Ratificado	No han sido establecidos

<b>México</b>	Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados	Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)	Ratificado	No han sido establecidos
---------------	---	---	------------	--------------------------

### 2.3 Detección de OGMs

Los sistemas de detección para OGMs se basan en los elementos presentes en la secuencia de ADN insertada, ya sea a través de la detección directa de la molécula de ADN insertada en el genoma o mediante el producto proteico y subproductos resultantes de la expresión del inserto de ADN (Tengs *et al.*, 2007; Elenis, 2008).

Las pruebas basadas en los productos proteicos, como la prueba de ELISA, son accesibles pero no son adecuadas para analizar los alimentos procesados ya que los epítomos importantes pueden desnaturalizarse durante el proceso de elaboración del producto final. Debido a que el DNA es una molécula más estable, los métodos basados en DNA son los más utilizados para la detección de OGMs.

La tecnología más utilizada basada en ADN para las pruebas de OGMs es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Holst-Jensen, 2003). La tecnología de PCR permite la amplificación en mil millones de veces de nanogramos del ADN templado, obteniendo resultados cualitativos o cuantitativos. El PCR cuantitativo (qPCR) es muy común, ya que combina la alta sensibilidad con la posibilidad de cuantificar el contenido de modificaciones genéticas, mediante la comparación de que para una cierta cantidad de templado correspondiente al promotor se deben presentar cantidades equivalentes del transgen y del terminador, y mediante la relación del ADN amplificado del organismo no modificado y del OGM (Bertheau *et al.*, 2002; Marmioli, 2008).

Diferentes tipos de elementos genéticos son estudiados en los análisis para OGMs. Como se ha ilustrado en la Figura 1, los elementos de detección más comunes son los elementos promotores o los genes terminadores, como: el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador tNOS (gen de la Nopalina Sintetasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*), y los genes que codifican ciertos rasgos de interés (Conceição, 2004). Estas herramientas son funcionales en la medida que se conozca el gen introducido como transgen y que se utilicen las construcciones habituales. Sin embargo existen otros promotores y terminadores recientemente utilizados, como el promotor de ubiquitina de maíz que representa una de las muchas opciones experimentales de promotores (Kim *et al.*, 2010; Tengs *et al.*, 2007).

La nueva tecnología de los microarreglos de ADN puede simplificar el arduo proceso que requiere la técnica de PCR. Los microarreglos de DNA permiten hacer pruebas en paralelo de una gran variedad de características en un solo ensayo y, por lo tanto, ofrecen una ventaja sobre las tecnologías establecidas. Esto es posible por su alto grado de miniaturización (10,000 genes por  $\text{cm}^2$ ), en donde cientos de miles de características pueden ser probadas con volúmenes de muestra muy pequeños. La base fundamental de la tecnología de los microarreglos es la hibridación paralela de una mezcla de ácidos nucleicos (ADN de las muestras de interés) con cientos de especies individuales de ácidos nucleicos (sondas) unidas covalentemente en una fase sólida. Las sondas tienen una locación específica en el arreglo, para así ser identificados por su posición espacial en un solo tratamiento, mientras que el ADN de las muestras, es marcado con moléculas fluorescentes que pueden ser detectadas por un escáner y depositado como solución en el arreglo con el propósito de hibridarse. La clave de esta tecnología es que las sondas son detectadas a un nivel proporcional de la cantidad de ADN de la muestra presente en el extracto (López-Campos *et al.*, 2012). Como se inmovilizan secuencias diferentes, es factible realizar una detección paralela de una amplia variedad de objetivos. Esta estrategia proporciona resultados más avanzados que los métodos básicos de detección basados en PCR, permitiendo la posible cobertura de todos los elementos transgénicos presentes (Rudi, 2003; Bordoni, 2005).

De esta manera, una de las aplicaciones de los microarreglos es la detección de modificaciones genéticas en alimentos, productos y semillas para detectar OGMs autorizados o no autorizados de una manera más integral, específica y sensible (Von Götz, 2010).

#### **2.4 Tecnologías de microarreglos desarrolladas en los últimos años**

En 2002, Blais y colaboradores desarrollaron un microarreglo simple con sondas marcadas en un soporte sólido de poliéster, sin embargo solo introdujeron CaMV35s y Nos para la detección de la construcción transgénica, lo que empobrece el éxito de la técnica para la detección de otros eventos transgénicos que contengan diferentes promotores y terminadores.

Bordoni *et al.* (2005), diseñó un sistema para la detección paralela de cinco eventos transgénicos en alimentos, mediante la aplicación de PCR multiplex y un microarreglo. Sin embargo no se utilizaron elementos promotores para la detección.

Leimanis *et al.* (2006), presentó una nueva tecnología más confiable para la detección de transgénicos, llamada Silverquant que detecta amplicones de PCR biotinilados mediante precipitación con nitrato de plata. La combinación de PCR y el microarreglo incluía siete eventos específicos, cinco genes de plantas, un control de contaminación por virus y solo dos elementos promotores y terminadores.

Tengs *et al.* (2007), diseñaron un microarreglo para la detección de modificaciones genéticas desconocidas, seleccionando 25 sondas que cubrían grandes fracciones de secuencias de las construcciones transgénicas más utilizadas. Dichas secuencias fueron seleccionadas únicamente por contener parcialmente o en su totalidad al promotor CaMV35s.

Zhou *et al.* (2008), desarrollaron una técnica para la detección de cultivos genéticamente modificados mediante la combinación de PCR multiplex y un microarreglo de DNA de baja densidad. Para la detección de la construcción transgénica utilizaron 17 sondas, de las cuales cuatro correspondían a los promotores CaMV35s1 y CaMV35s2 y los terminadores Nos y Pnos y el resto a posibles genes de interés.



Kim *et al.* (2010), diseñaron un microarreglo de DNA evento específico para la identificación de 19 transgénicos. El microarreglo incluía 27 sondas optimizadas para identificar eventos específicos, el promotor CaMV35s, el terminador Nos, y un gen interno. A pesar de los grandes avances, la mayoría de las nuevas tecnologías de microarreglos para la detección de transgénicos permanecieron en pruebas de laboratorio, solo pocos paquetes comerciales fueron desarrollados para su aplicación de rutina en laboratorios de diagnóstico, principalmente por el alto costo del lector de fluorescencia que se requiere para el microarreglo (aproximadamente \$70,000.00 dólares).

En 2001, GeneScan Freiburg (Alemania) desarrollo el GMOChip, un sistema de detección de transgénicos basado en microarreglos. Se incluyeron 14 elementos diferentes, con cuatro marcadores de plantas, cinco marcadores de eventos específicos, controles y CaMV35s y Nos. El chip fue discontinuado en 2003.

En 2006, Eppendorf (Alemania) lanzó el paquete DualChip GMO kit, que detecta 14 elementos; cinco marcadores de plantas y nueve genes de interés (Hamels *et al.*, 2009). En 2007 se llevó a cabo un estudio en los Estados Unidos, para validar su practicidad en un laboratorio de análisis de rutina, logrando detectar hasta 0.1% del contenido de material genéticamente modificado con una precisión del 95% (Hamels *et al.*, 2007). Una nueva versión de DualChip GMO V2.0, fue presentada en 2008, que puede detectar hasta 30 elementos transgénicos, incluyendo siete elementos de la planta, 11 eventos específicos y solamente el promotor CaMV35s y terminador Nos.

En 2012, el Laboratorio de microarreglos de la UNAM, desarrolló un microarreglo para detección de OGMs sobre la base de PCR multiplex, para 182 elementos utilizados en construcciones transgénicas, 69 sondas evento específicas y 18 marcadores para plantas. También presentó el desarrollo de un lector para microarreglos con aplicación en diagnóstico de microorganismos patógenos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de la controversia sobre si los transgénicos son benéficos o dañinos para los humanos, animales y/o el ecosistema, el número de transgénicos cultivados incrementa cada año. Muchos países y federaciones han implementado sistemas de seguridad y vigilancia para transgénicos. Es por ello que se requieren medidas como el etiquetado de los productos transgénicos para consumo tanto animal como humano. Las herramientas para la identificación de transgénicos están basadas en la detección de la proteína transgénica (mediante pruebas de ELISA) o en la identificación de fragmentos de ADN necesarios para la producción de la proteína transgénica, tales como el promotor CaMV35S y el terminador Nos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recientemente mediante microarreglos. Éstas herramientas además de costosas tienen la desventaja de ser funcionales en la medida que se conozca el gen introducido como transgen y que se utilicen las construcciones habituales como el promotor 35S y terminador NOS. Ya que si se utilizan otros promotores y terminadores, como el promotor de ubiquitina de maíz (recientemente propuesto por la comunidad científica) que representa una de las muchas opciones experimentales de promotores, no podría ser detectado como transgénico por los procedimientos establecidos.

Es por ello que el presente proyecto plantea la necesidad de desarrollar una técnica eficaz que permita identificar un mayor número de elementos transgénicos en un producto, sin la necesidad de conocer previamente el origen del transgen, permitiendo así un etiquetado más informativo y completo del producto.

### **4. HIPÓTESIS**

Si diversos alimentos procesados disponibles para el consumo humano, presentan elementos transgénicos en las materias primas empleadas, entonces será posible la detección de secuencias que indiquen modificación genética, mediante el diseño de un arreglo molecular basado en análisis bioinformáticos de los promotores y terminadores de genomas existentes, secuencias comerciales y en desarrollo.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Diseñar y fabricar un arreglo molecular para la identificación de regiones promotoras y terminadoras comúnmente utilizadas en la construcción de organismos genéticamente modificados.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Seleccionar sondas derivadas de un análisis bioinformático de las regiones promotoras y terminadoras de los genomas existentes en las bases de datos, de construcciones comerciales de vectores de expresión y de construcciones experimentales.
2. Diseñar un arreglo molecular capaz de identificar la presencia de secuencias que indican modificación genética en diversos alimentos transgénicos.
3. Validar la eficacia del arreglo molecular para la detección de alimentos transgénicos que se encuentran en libre comercialización.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Muestras**

Se seleccionaron 5 alimentos altamente procesados conteniendo maíz y trigo; 3 harinas de trigo y 2 harinas de maíz, y 4 cultivos de maíz, soya, trigo y arroz germinados de semillas adquiridos de comercios locales en La Paz, B.C.S. Como controles positivos se eligieron organismos genéticamente modificados que se encuentran en confinamiento en el

laboratorio de Biotecnología Vegetal de CIBNOR; *Medicago sativa* var. Reagen SY27 (pMDC32) y *Zea mays* B73 (PBI121), y 6 muestras de ADN de referencia proporcionados por SENASICA, MON 88913-8, DAS 59122-7, SYN-BT011-1, SYN-IR604-5, MON 87460-4 y DAS 1507-1.

### 6.1.1 Extracción de ADN

El ADN genómico de los cultivos de maíz, soya, arroz y trigo, fue extraído por el método de CTAB al 2% (Zhan *et al.*, 1998). La extracción del ADN de los productos altamente procesados también se realizó por el método de CTAB al 2% con algunas modificaciones. Para ello, 2 gr de cada muestra fueron incubados por 1 hr a 60°C con 10 ml del Buffer de extracción CTAB (0.1 M Tris-HCL, 20 g/L CTAB, 1.4 M NaCl y 20 mM NA<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0), posteriormente se agregaron 15 µl de proteinasa K a un mililitro de esta suspensión permaneciendo a 60°C por 1 hr. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm (5 min a temperatura ambiente), el sobrenadante fue mezclado con 600 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (PCI 25:24:1), y centrifugado a 15000 rpm (10 min a temperatura ambiente). Este último paso fue repetido dos veces más, para un total de tres extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de isopropanol a -20°C mezclando por inversión, las muestras se almacenaron a -20°C toda la noche. Los tubos fueron centrifugados a 11000 rpm (20 min a 4 °C) y el pellet fue resuspendido en 100 µl de agua Miliq estéril mediante incubación a 60°C por 1 hr. Se agregaron 5 µl de RNAsa a cada tubo y se incubaron a 37°C por 1 hr. Se agregaron 200 µl de cloroformo:alcohol isoamilico (CIA 24:1), los tubos se agitaron vigorosamente por 60 segundos y se centrifugo a 11000 rpm (10 min a temperatura ambiente). Este último paso se repitió una segunda ocasión, para un total de dos extracciones con cloroformo:alcohol isoamilico. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se adicionaron 50 µl de acetato de amonio 7.5 mM, se mezcló por inversión y se agregaron dos volúmenes de etanol al 100% se mezcló por inversión y se almacenaron a -20°C por 1 hr. Finalmente las muestras se centrifugaron a 11000 rpm (20 min a 4°C), la pastilla de ADN fue lavada dos veces con 1 mL de etanol al 70% el etanol y resuspendida

en 50 µl de agua Miliq esteril. Por último, se cuantificó la concentración de ADN mediante el uso de un espectrofotómetro (NanoDrop ND-100).

## 6.2 Análisis y selección de secuencias para diseño de sondas

Se seleccionaron promotores y terminadores comúnmente utilizados en la construcción de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), soya (*Glycine max*) y arroz (*Oryza sativa*) genéticamente modificados, de construcciones comerciales de vectores de expresión más usadas nacional e internacionalmente (Monsanto Company, Syngenta Seeds, Inc. (Zeneca Seeds), DOW AgroSciences LLC, Pioneer Hi-Bred International Inc, Origin Agritech, Bayer CropScience, DuPont Pioneer, Dekalb Genetics Corporation, Aventis CropScience), vectores experimentales y genomas existentes en las bases de datos (PlantProm: Plant Promoter Database, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=plantprom&group=data&subgroup=plantprom> y TGP: Database on Plant Promoters for Transgenesis, <http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/dbases/tgp/home.html>). Además, se incluyeron genes de selección como controles para organismos genéticamente modificados y genes endógenos de referencia para plantas, *Z. mays*, *T. aestivum*, *G. max* y *O. sativa*.

## 6.3 Criterios para el diseño de Sondas

Se descargaron los genomas correspondientes a *Z. mays*, *G. max* y *O. sativa* en formato FASTA de la plataforma del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Debido a que el genoma de *T. aestivum* no se encuentra totalmente secuenciado, se utilizó únicamente el cromosoma 3B (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FN645450.1>).

Se utilizó el algoritmo BLASTn (Nucleotide-Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool 2.2.25) mediante el sistema operativo ubuntu 12.04 LTS para realizar un alineamiento local de los promotores y terminadores con los genomas de *Z. mays*, *G. max*, *O. sativa* y *T. aestivum*, con el fin de conocer la similitud entre dichas secuencias.

Posteriormente se realizó el diseño de las sondas en el programa OligoArray 2.1 (Genome-scale oligonucleotide design for microarrays) mediante el sistema operativo ubuntu 12.04 LTS, con un tamaño de 50 pb, una distancia máxima de 1500 pb entre el extremo 5' de la sonda y el extremo 3' de la secuencia sometida, una temperatura de fusión ( $T_m$ ) con un rango de 85-90°C, un contenido de GC de 40-60% y una temperatura de 65°C para la predicción de estructuras secundarias e hibridación cruzada.

#### **6.4 Diseño de cebadores**

Se realizó el diseño de cebadores con el programa Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) utilizando como molde las secuencias de las sondas seleccionadas en el paso anterior. Además, se diseñaron cebadores adicionales para la detección de las sondas de promotores endógenos.

Los cebadores diseñados también serán utilizados para la amplificación de las muestras de ADN de los productos o cultivos.

#### **6.5 Estandarización de amplificación individual**

Para estandarizar la amplificación para PCR multiplex de cada uno de los cebadores diseñados y determinar las temperaturas de alineación de cada uno, se utilizó ADN genómico de maíz, soya, trigo y arroz (para el caso de amplificación de genes endógenos) y ADN de materiales de referencia proporcionados por SENASICA (para amplificar elementos transgénicos específicos) (Tabla VI). En algunos casos se utilizó el mejorador (*enhancer*) betaina como aditivo para incrementar el rendimiento de los productos. La reacción por muestra se preparó de acuerdo a la Tabla V.

**Tabla V.** Mezcla de reacción de PCR punto final para estandarización de amplificación

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen <math>\mu</math>l</b>
H <sub>2</sub> O MQ	-	14.25
Buffer 5x	-	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP's	2.5 mM	2
Cebadores	20 $\mu$ M	1
Taq polimerasa	5 unidades/ $\mu$ l	0.25
Templado	50-100 ng/ $\mu$ l	1
Betaina	1M	1

Las reacciones se realizaron utilizando el equipo PTC-200. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C por 10 min., seguido de treinta ciclos de 95 °C por 30 seg, gradiente de temperatura de alineación hasta dos grados por encima de su T<sub>m</sub> por 45 seg, 72 °C por 1 min y finalmente 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron purificados por medio de columnas GFX (ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit) y la secuencia de nucleótidos se determinó en ambas cadenas, usando los cebadores F y R correspondientes. El servicio de purificación y secuenciación de amplicones fue realizado por la compañía GENEWIZ, INC (NJ, USA; <http://www.genewiz.com>). Se realizaron análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas con aquellas reportadas en el banco de datos del National Center for biotechnology information usando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

## 6.6 Validación del Arreglo

Para la validación del arreglo molecular se utilizaron como controles positivos de transformación genética, ADN de referencia facilitados por SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) Tabla VI.

**Tabla VI.** Materiales de Referencia de construcciones transgénicas.

<b>Especie</b>	<b>Material de Referencia</b>	<b>Evento</b>
	36	DAS-1507-1
	46	MON-87460-4
	100	<i>Z. mays</i> convencional
	111	DAS-59122-7
	119	MON-00021-9
	120	SYN-BT011-1
	122	SYN-IR162-4
<i>Zea mays</i>	125	SYN-IR604-5
	142	MON-89034-3 x MON-00603-6
	167	MON-00603-6
	169	MON-00810-6
	232	MON-88017-3 x MON-89034-3
	305	MON-00863-5
	308	MON-88017-3
	887	SYN-EV176
	134	MON-15985-7 x MON-88913-8
	185	MON-88913-8
<i>Gossypium hirsutum</i>	89	MON-01445-3
	278	DAS-24236-5 x DAS-21023-5
	c-	<i>G. hirsutum</i> convencional
	174	<i>G. max</i> convencional
<i>Glycne max</i>	314	MON-04032-6
	460	DP-356043-5
<i>Oryza sativa</i>	848	<i>O. sativa</i> convencional
<i>Medicago sativa</i>	879	MON-00179-5 x MON-00101-8
<i>Triticum aestivum</i>	161	<i>T. aestivum</i> convencional



### 6.7 Amplificación y marcado de las muestras de cultivos o productos

La amplificación y marcado del ADN genómico de las muestras de alimentos procesados así como de los germinados de semillas y controles positivos, se realizó mediante PCR multiplex en el Instituto de Fisiología de la UNAM, Unidad de Microarreglos. Para ello se preparó un mix de los 85 cebadores diseñados con una concentración de 40  $\mu\text{M}$  y se utilizó el fluoróforo Cy3 para su marcado. La reacción por muestra se preparó de acuerdo a la Tabla VII.

**Tabla VII.** Mezcla de reacción para PCR multiplex

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen <math>\mu\text{l}</math></b>
H <sub>2</sub> O DEPC	-	4.9
Buffer 5x (1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 1X)	-	7.5
dNTP's marcado con Cy3	2.5 mM	1.5
Mix de cebadores	40 $\mu\text{M}$	10
Taq polimerasa	5 unidades/ $\mu\text{l}$	0.1
Templado	50-100 ng/ $\mu\text{l}$	1

Las reacciones se realizaron utilizando el equipo PTC-200. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C por 10 min., seguido de treinta ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min y finalmente 72 °C por 5 min.

### 6.8 Impresión del Arreglo de ADN

Las sondas diseñadas fueron sintetizadas e impresas por la empresa MYcroarray (University of Michigan, Chemical Engineering Dept.) en 10 laminillas con seis subarreglos cada una.

## 6.9 Hibridización con ADN genómico de las muestras de cultivos o productos

### 6.9.1 Pretratamiento del Arreglo

Las laminillas utilizadas se prehidrataron exponiendo el lado impreso al vapor de agua a 60°C durante 5 segundos, se volteó el chip para secar y se volvieron a exponer al vapor (2 veces).

### 6.9.2 Hibridación

Las hibridaciones se realizaron de acuerdo a la siguiente reacción:

**Tabla VIII.** Mezcla para hibridación

<b>Mezcla por muestra</b>	<b>Volumen <math>\mu</math>l</b>
Productos de PCR	5.5
Solución de Hibridación 2X (12X SSC, 0.2% Dextran, 0.02% tween 20)	5.5
Volumen total	11

Se efectuó una desnaturalización a 94 °C por 5 min y 30 seg a 65 °C, se agregó la mezcla al microarreglo, cubriendo la superficie con un cubreobjetos, la incubación se hizo durante toda la noche a 42 °C en una cámara de hibridación humidificada.

Al día siguiente se realizaron lavados a temperatura ambiente y agitación. Los lavados fueron 3 durante 5 min cada uno, el primero con 50 ml de SSC 1X-SDS al 0.05%, el segundo y el tercero solo con SSC 0.06X. Finalmente la laminilla se secó por centrifugación a 1500 rpm por 2 min.

### 6.10 Lectura del Arreglo en Scanner

Para la obtención de las imágenes se realizó en un scanner GenPix 4100<sup>a</sup> con los parámetros recomendados por el fabricante con una resolución de 5 micras. A las imágenes obtenidas se les aplicó un filtro medio, para depurar la imagen de pequeñas imperfecciones o señales no deseadas que pudieran encontrarse entre las imágenes. Para obtener los valores

cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en los arreglos, se realizó el análisis de las imágenes, con el software GenePix (del Instituto de Fisiología de la UNAM, Unidad de Microarreglos, Dr. Jorge Ramírez). El análisis consiste en la generación de una retícula en la que se definieron las áreas a cuantificar. Definida la retícula, se determinó una zona de exclusión y el área para calcular la señal de fondo de la imagen. Definidos estos parámetros el programa calculó la densidad de los pixeles en cada área definida, dando como resultado las coordenadas, los valores de densidad, fondo y señal para cada una de las sondas en el microarreglo. Esta información fue correlacionada con la base de datos del arreglo, donde se conoce la locación de cada una de las sondas impresas en las laminillas.

### 6.11 Validación por secuenciación de los elementos detectados en el arreglo

Se realizó PCR de punto final para la identificación de los elementos detectados en los arreglos. La reacción por muestra se preparó de acuerdo a la Tabla IX.

**Tabla IX.** Mezcla de reacción de PCR punto final para validación de elementos detectados.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen <math>\mu</math>l</b>
H <sub>2</sub> O MQ	-	15.25
Buffer 5x	-	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP's	2.5 mM	2
Cebadores	20 $\mu$ M	1
Taq polimerasa	5 unidades/ $\mu$ l	0.25
Templado	50-100 ng/ $\mu$ l	1

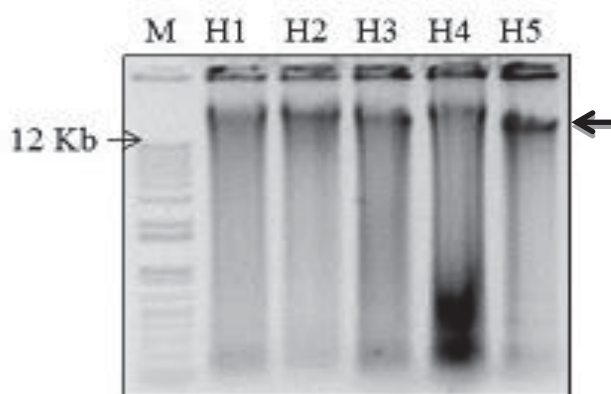
Las reacciones se realizaron utilizando el equipo Rotor-Gene 6000 series. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C por 10 min., seguido de treinta ciclos de 95 °C por 30 seg, gradiente de temperatura de alineación hasta dos grados por encima de su T<sub>m</sub> por 45 seg, 72 °C por 1 min y finalmente 72 °C por 5 min.

La secuenciación y análisis de los productos de PCR fueron realizados como se describe en la sección 6.5.

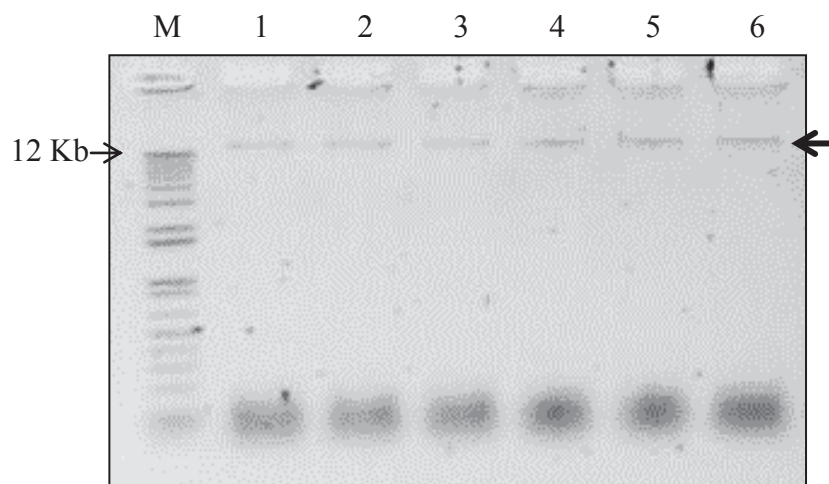
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Cuantificación y calidad del ADN

Con la finalidad de realizar las hibridaciones con los microarreglos, se realizó la extracción y cuantificación del ADN de las muestra de alimentos procesados (Figura 2), de muestras de semillas de maíz, soya, trigo y arroz, y los controles positivos de transformación genética (Figura 3), para posteriormente amplificarlos y marcarlos por PCR multiplex. Pudimos observar una banda mayor a 12 Kb correspondiente al ADN genómico, en todas las muestras de harinas (Fig. 2), semillas de comercios locales y controles positivos de transformación del laboratorio de Biología Molecular de Plantas (Fig. 3). En la Tabla X se presentan la cuantificación y la calidad del ADN para cada una de las muestras de alimentos procesados y los controles positivos.



**Figura 2.** Gel de electroforesis de agarosa al 1% de ADN de harinas. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 1 kb plus, H1, H4 y H5 provienen de harina de trigo, H2 y H3 provienen de harina de maíz.



**Figura 3.** Gel de electroforesis de agarosa al 1% de ADN de muestras de semillas y controles positivos de transformación del laboratorio de Biología Molecular de Plantas. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 1 kb plus, 1: ADN genómico de maíz, 2: ADN genómico de soya, 3: ADN genómico de trigo, 4: ADN genómico de arroz, 5: ADN de maíz transgénico (PBI121), 6: ADN de alfalfa transgénica (pMDC32).

**Tabla X.** Cuantificación de ADN de muestras de alimentos procesados, germinados de semillas y controles positivos de transformación genética.

Muestras	Clave	ng/uL	260/280
ADN de alimentos procesados	H1	2802.6	1.84
	H2	1485.3	1.74
	H3	2247.8	1.83
	H4	1429.0	1.77
	H5	1794.7	1.82
ADN genómico de maíz	1	831.4	1.81
ADN genómico de soya	2	1,150.3	1.85
ADN genómico de trigo	3	971.6	1.84
ADN genómico de arroz	4	836.6	2.04
ADN de maíz transgénico (PBI121)	5	1,386.0	1.84
ADN de alfalfa transgénica (pMDC32)	6	948.7	1.68

## 7.2 Análisis y selección de secuencias para diseño de sondas

Se seleccionaron 13 promotores y siete terminadores para la identificación de *Z. mays*, *T. aestivum*, *G. max* y *O. sativa* genéticamente modificados (Anexo 1). Siete genes de selección fueron incluidos como controles positivos para organismos genéticamente modificados (Bar, Pat, Gox, barnase, nptII, cp4epsps y Cry1Ab) y 5 genes endógenos de referencia para plantas, *Z. mays*, *T. aestivum*, *G. max* y *O. sativa*, respectivamente: RbcL (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase), zeina, lectina, SPS (Sucrose phosphate synthase) y PRP (Proline-rich protein).

## 7.3 Diseño de Sondas

Se diseñaron un total de 33 sondas para la identificación de 13 promotores, 7 terminadores, 7 genes de selección, 5 genes endógenos de referencia y 1 gen como control negativo (Anexo 2).

Dado que el alineamiento local de los promotores y terminadores con los genomas de *Z. mays*, *G. max*, *O. sativa* y *T. aestivum* por medio de BLASTn determinó que existen 2176 regiones homologas con ocho promotores endógenos; MTL (metallothionein-like), UbiZm1 (ubiquitin 1), zeina, Glb-1 (globulin 1), SAMS (adenosyl-L'methionine synthetase), 7s  $\alpha'$  (Sphas1), RAMy3A (Alpha-amylase) y ract1 (actin) con *Z. mays*, *G. max* y *O. sativa*, se realizó el diseño de 12 sondas adicionales entre la región del promotor y la secuencia codificante del gen regulado, para de esta manera distinguir los promotores endógenos de ellos mismos cuando se encuentren en otra posición como genes exógenos (Anexo 3). El promotor Glb-1 fue descartado al presentar más de 20 homologías con el genoma *Z. mays*.

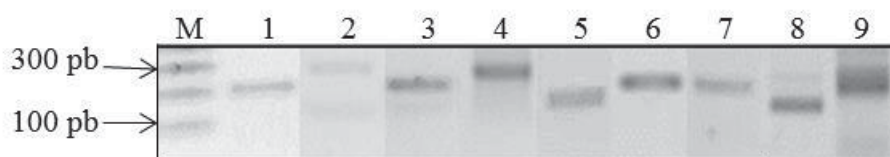
## 7.4 Diseño de cebadores

Se realizó el diseño de 66 cebadores con el programa Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para la amplificación de las sondas de los 13 promotores, 7 terminadores, 7 genes de selección, 5 genes endógenos de referencia y el gen de *E. coli* usado como control negativo (Anexo 4). Además, se diseñaran 16 cebadores adicionales

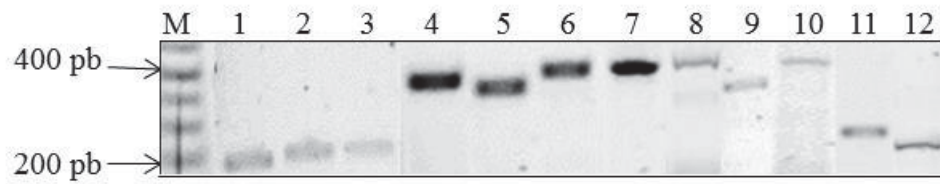
para la detección de las sondas colocadas entre la región del promotor y el gen que regulan, generando un amplicón menor a 500 pb con al menos 200 pb dentro de la región del promotor (Anexo 5).

### 7.5 Estandarización de amplificación individual

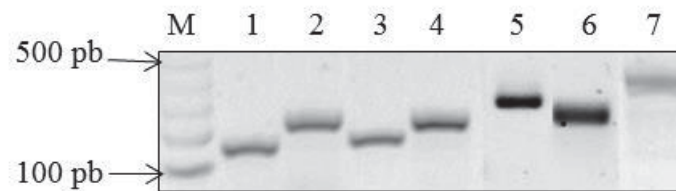
La estandarización de la amplificación de los elementos endógenos y promotores utilizados como transgenes en otros cultivos de maíz, soya, trigo y arroz, se probó utilizando como templado ADN genómico de dichos organismos (Figura 4) y se observó amplificación específica de todos los elementos endógenos y promotores utilizados como transgenes en otros cultivos (Figura 4, Figura 5 y Figura 6). Para probar los elementos transgénicos, se utilizó ADN genómico de controles positivos proporcionados por SENASICA (Tabla VI), los productos de la amplificación se muestran en la Figura 7. Se observaron amplificaciones específicas con producto único para los elementos: MTL, tahsp 17, P-SAMS, UbiZm1, FMV, FMV/tsf1, NOS, Pat y nptII (Figura 7A). Para mejorar la especificidad de la amplificación de los elementos: ract1, Bar, E9, y Cry1Ab, se modificó la temperatura de alienación y se utilizó betaina (Figura 7B). No fue posible estandarizar la amplificación de producto único para los cebadores del elemento: cp4epsps (Fig. 7B, carril 16) y el diseño de cebadores para los elementos: 3'35s, PinII y Tr7 no presentaron amplicón (Figura 7B, carril 6, 10, 12 respectivamente), por lo que se deberán realizar nuevos diseños para posteriores estudios.



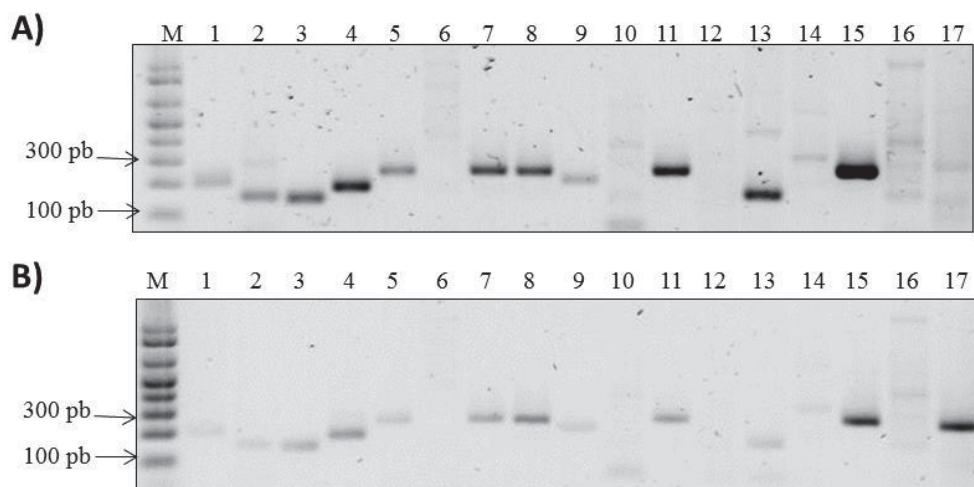
**Figura 4.** Gel de electroforesis de agarosa al 1% de los amplicones de elementos endógenos de maíz y trigo. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 1 kb plus, 1: MTL, 2:UbiZm1, 3:PGIb1, 4: PZein, 5:TGIb1, 6: zein, 7: rbcl, 8: PRP, 9: tahsp17.



**Figura 5.** Gel de electroforesis de agarosa al 1% de los amplicones de elementos endógenos de Soya. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 1 kb plus, 1: PSAMS, 2:7S  $\alpha'$ , 3: lectin, 4: ESAMS1, 5: ESAMS2, 6: ESAMS3, 7: ESAMS4, 8: ESAMS5, 9: ESAMS6, 10: ESAMS8, 11: E7s1, 12:E7s2.



**Figura 6.** Gel de electroforesis de agarosa al 1% de los amplicones de elementos endógenos de Arroz. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 1 kb plus, 1:ract1, 2: Gtl1, 3: RAmy3A, 4: SPS, 5: EGtl, 6: ERAmy3A, 7: Eract1.





**Figura 7.** Gel de electroforesis de agarosa al 1% de los amplicones de controles positivos de transformación genética proporcionados por SENASICA. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 1 kb plus, 1: MTL (MR 125), 2: ract1 (MR 308), 3: tahsp 17 (MR 308), 4: P-SAMS (MR 460), 5: UbiZm1 (MR 36), 6: 3'35S (MR 36), 7: FMV (MR 142), 8: FMV/Tsfl (MR 134), 9: NOS (MR 120), 10: PinII (MR 111), 11: Pat (MR 111), 12: Tr7 (MR 46); 13: Bar (MR 887) 14: E9 (MR 134, 15: nptII (MR 189), 16: cp4epsps (MR 189), 17: Cry1Ab (MR 169). (A) Amplificación sin estandarización de temperaturas con 40mM de betaína (B) Amplificación con estandarización de temperaturas con 40mM de betaína.

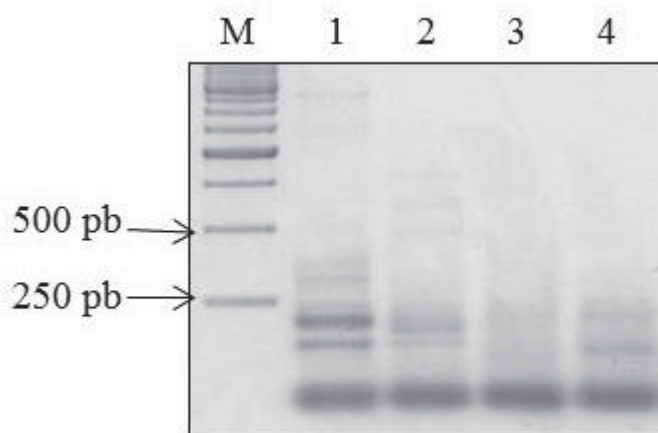
En la Tabla XI, Se presentan los resultados de secuenciación para los amplicones de controles positivos proporcionados por SENASICA.

**Tabla XI.** Verificación de amplicones detectados por secuenciación.

<b>Amplicón</b>	<b>Identidad</b>	<b>E Value</b>
Bar	100%	9e-47
FMV	100%	9e-100
FMV-tsfl	100%	4e-98
MTL	99%	6e-76
NOS	100%	2e-80
nptII	100%	7e-101
pat	100%	3e-99
P-SAMS	86%	1e-17
Ract1	99%	4e-45
tahsp17	100%	1e-45
UbiZm1	99%	3e-100
Cry1Ab	99%	7e-87

## 7.6 Amplificación y marcado de las muestras de cultivos o productos

En la Figura 8 se muestra un gel de electroforesis, donde podemos observar la amplificación de diversos templados por medio de PCR multiplex.



**Figura 8.** Perfil de amplificación por PCR multiplex de diversos templados. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 250 pb, 1: maíz transgénico PBI121, 2: Alfalfa transgénica pMDC32, 3: DNA de harina de trigo (H1), 4: DNA de harina de maíz (H2).

## 7.7 Hibridización con ADN genómico de las muestras de cultivos o productos

Se realizaron ocho hibridaciones (Siete hibridaciones en Instituto de Fisiología de la UNAM, Unidad de Microarreglos y una en CIBNOR) con 16 muestras; dos controles positivos de cultivos transgénicos, seis materiales de referencia de eventos transgénicos facilitados por SENASICA, cuatro muestras de semillas de maíz, soya, trigo y arroz y cinco muestras de alimentos procesados. En la Figura 9, se muestra una de las laminillas colocada en la cámara de hibridación humidificada previa a su incubación. La primera hibridación (laminilla A) con los germinados de semillas y los controles positivos, se realizó por triplicado, la segunda hibridación (laminilla B) con un control positivo y cinco muestras de harinas se realizó por duplicado, la tercera hibridación (laminilla C) con seis eventos

transgénicos (SENASICA) y se utilizaron dos laminillas para estandarizar la hibridación y lectura de los chips (Figura 10).



**Figura 9.** Laminilla impresa por Microarray en la cámara de hibridación humidificada.

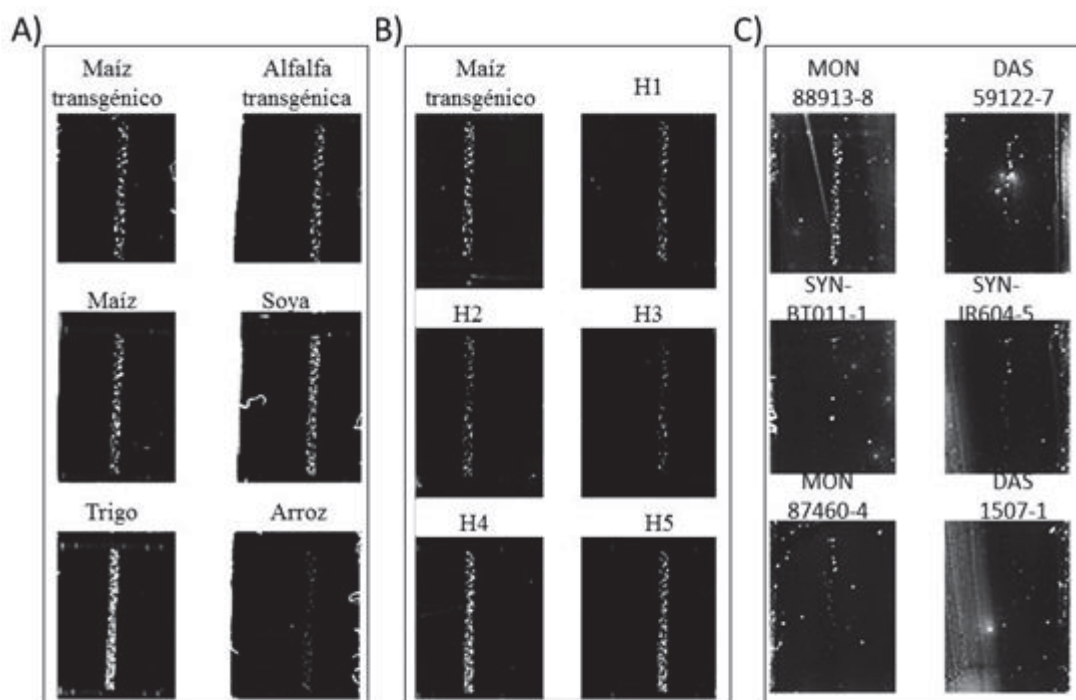
### **7.8 Identificación de elementos endógenos y transgénicos en muestras control, germinados de semillas y productos procesados**

Una vez efectuada la metodología de microarreglos, los chips fueron escaneados y los datos fueron procesados. Para determinar si los valores de las señales fueron significativos, se definieron los valores promedio para la densidad y el fondo de cada una de las sondas en los arreglos. Además, se realizó un filtro o *flag* del cociente de la fluorescencia promedio contra el fondo promedio, donde todos los valores para las relaciones (densidad/fondo) deben ser mayores o iguales a este filtro para ser considerados como significativos. Cabe señalar, que fueron aplicados diferentes filtros para cada una de las laminillas analizadas, debido a las notables diferencias de la relación densidad/fondo entre ellas.

En las tablas XII, XIII y XIV se presentan los resultados de fluorescencia, fondo, promedios y el filtro aplicado para determinar los elementos transgénicos detectados en cada muestra, en donde por ejemplo en el caso del maíz transgénico (PBI121) se detectaron los elementos: CaMV35s, nptII, P-Glb1 y SPS (Tabla XII).

De todos los elementos identificados por el microarreglo, se seleccionaron y secuenciaron para confirmar su identidad, aquellos elementos que no corresponden a elementos endógenos de la muestra, es decir, elementos transgénicos presentes (Tabla XV). Se identificaron 4 granos y 2 harinas tomadas de comercios locales, que contienen alguno de

los elementos transgénicos: P-Glb-1, 7s, P-SAMS, tahsp17. Igualmente se identificaron elementos transgénicos “no declarados” en algunas de las construcciones de patente que se utilizan como controles positivos en SENASICA (Tabla XIV). Todos los amplicones se corroboraron por secuenciación (Tabla XV).



**Figura 10.** Hibridación de las laminillas. Cada laminilla tiene 6 sub arreglos que contienen los elementos transgénicos. A) Se hibridaron las siguientes muestras: muestras de maíz transgénico (PBI121) y alfalfa transgénica (pMDC32), tomadas del Lab. de Biol. Mol. Plantas. Las muestras de maíz, soya, trigo y arroz fueron tomadas de semillas de comercios locales de La Paz, B. C. S. B) Se hibridó maíz transgénico (PBI121), harina de trigo (H1), harina de maíz (H2), harina de maíz (H3), harina de trigo (H4), harina de trigo (H5). C) Se hibridaron: MON 88913-8, DAS 59122-7, SYN-BT011-1, SYN-IR604-5, MON 87460-4, DAS 1507-1.

**Tabla XII.** Detección de elementos transgénicos por hibridación en la laminilla A.

Muestra	Nombre	Promedio mediana F	Promedio mediana B	Filtro 20
PBI 121	CaMV35s	59207.7	1533.0	VERDADERO
	nptII	59000.6	1510.2	VERDADERO
	P-Glb1	59000.6	1475.7	VERDADERO
	SPS	59000.6	1479.3	VERDADERO
Alfalfa transgénica	CaMV35s	59544.9	1507.5	VERDADERO
	ESAMS5	59544.9	1504.8	VERDADERO
	nptII	63380.9	1527.8	VERDADERO
	P-Glb1	60922.0	1513.0	VERDADERO
	rbcl	60922.0	1524.7	VERDADERO
	SPS	62869.0	1555.6	VERDADERO
Maíz	ESAMS5	62443.8	1575.0	VERDADERO
	P-Glb1	62650.9	1579.3	VERDADERO
	SPS	59919.0	1607.2	VERDADERO
	zein	59919.0	1636.3	VERDADERO
Soya	7S	56311.7	1632.8	VERDADERO
	E7s1	56311.7	1674.9	VERDADERO
	ESAMS5	53542.9	1680.1	VERDADERO
	P-Glb1	56001.8	1709.4	VERDADERO
	P-SAMS	56001.8	1750.5	VERDADERO
	rbcl	56001.8	1769.4	VERDADERO
	SPS	54721.6	1793.9	VERDADERO
Trigo	Bar	51744.9	1811.3	VERDADERO
	EGtl-1	54476.8	1796.6	VERDADERO
	Eract1	53116.9	1726.7	VERDADERO
	ESAMS2	55745.2	1730.8	VERDADERO
	ESAMS3	54521.5	1699.8	VERDADERO
	ESAMS5	56903.6	1714.3	VERDADERO
	PRP	55465.0	1711.7	VERDADERO
	SPS	53451.0	1671.6	VERDADERO
	TA29	50430.0	1607.3	VERDADERO
	tahsp 17	51079.7	1542.0	VERDADERO
	zein	58735.5	1460.0	VERDADERO
Arroz	SPS	51936.0	1175.0	VERDADERO

**Tabla XIII.** Detección de elementos transgénicos por hibridación en la laminilla B.

Muestra	Nombre	Promedio mediana F	Promedio mediana B	Filtro 13
PBI 121	CaMV35s	61151.2	2184.9	VERDADERO
	Cry1Ab	60224.9	2169.6	VERDADERO
	nptII	45700	2350.1	VERDADERO
	P-Glb1	25896.3	2185.6	VERDADERO
	SPS	63852.7	2266.8	VERDADERO
	zein	48578.9	2402.3	VERDADERO
Harina de trigo (H1)	CaMV35s	30842.9	2206.2	VERDADERO
	ESAMS5	62226.2	2235.2	VERDADERO
	SPS	61151.2	2224.8	VERDADERO
Harina de maíz (H2)	CaMV35s	28828.6	2197.1	VERDADERO
	ESAMS5	61025.1	2339.8	VERDADERO
	P-Glb1	55849.9	2353.5	VERDADERO
	SPS	61151.2	2176.3	VERDADERO
	zein	20263.8	2123.3	VERDADERO
Harina de maíz (H3)	CaMV35s	21921.1	2133.9	VERDADERO
	SPS	61151.2	2153.8	VERDADERO
Harina de trigo (H4)	Bar	32587.7	2163.5	VERDADERO
	EGtl-1	60224.9	2350.7	VERDADERO
	ESAMS2	61907.2	2351.4	VERDADERO
	ESAMS5	61325.7	2317.3	VERDADERO
	PRP	63983.6	2265.6	VERDADERO
	SPS	61151.2	2173.1	VERDADERO
	tahsp 17	53145.3	2363.2	VERDADERO
	zein	45700	2135.4	VERDADERO
Harina de trigo (H5)	CaMV35s	26594.4	2190.3	VERDADERO
	ESAMS5	58608.2	2325.7	VERDADERO
	PRP	62301.3	2257.1	VERDADERO
	rbcl	35631.1	2163.9	VERDADERO
	SPS	61151.2	2184.2	VERDADERO
	tahsp 17	49904.2	2353.8	VERDADERO
	zein	40280.4	2169.2	VERDADERO

**Tabla XIV.** Detección de elementos transgénicos por hibridación en la laminilla C conteniendo controles positivos proporcionados por SENASICA.

Muestra	CERA*	Biosafety Scanner**	Detectados en éste trabajo	Promedio mediana F	Promedio mediana B	Filtro 2
MON 88913-8	P- FMV/TsF1 P-35S/ACT8 E9 cp4epsps	P- FMV/TsF1 P-35S/act8	Bar	14587.6	2072.9	VERDADERO
			CaMV35s	14350.7	2076	VERDADERO
			Cry1Ab	14101	2077.2	VERDADERO
			EGtl-1	14162.4	2065	VERDADERO
			Eract1	13905.6	2059.5	VERDADERO
			ESAMS2	13660.3	2059.6	VERDADERO
			ESAMS3	7728.7	2044.1	VERDADERO
			ESAMS5	10823.9	2045.4	VERDADERO
			FMV	10723.3	2041.4	VERDADERO
			Gox	11006.3	2051.2	VERDADERO
			NOS	11042.2	2026.5	VERDADERO
			nptII	10890.5	2003.1	VERDADERO
			Pat	11570	1983.2	VERDADERO
			PRP	16300.2	1980.4	VERDADERO
			ract1	17517.8	1989.6	VERDADERO
			rbcl	18518.8	1992	VERDADERO
			SPS	18118.4	1997.1	VERDADERO
tahsp 17	13671.7	1998.8	VERDADERO			
zein	16812.1	2008.7	VERDADERO			
DAS 59122-7	CaMV35s 3'35s cry34Ab1 cry35Ab1 pat UbiZm1 pinII P-TAperox	P-e35S 3' 35S cry34Ab1 cry35Ab1 pat P-UbiZm1 3' pinII P-TAperox	CaMV35s	17060.3	1977.5	VERDADERO
			ESAMS2	19448.2	1970.5	VERDADERO
			P-Glb1	20404.6	1997.7	VERDADERO
			zein	20004.9	2015.2	VERDADERO
			CaMV35s	17200.8	2032.3	VERDADERO
			P-Glb1	15622	2025.1	VERDADERO
SYN- BT011-1	Pat Cry1Ab CaMV35s nos	pat Cry1Ab P-e35S 3' nos	ract1	14483.8	2011.6	VERDADERO
			rbcl	15134.7	2002.2	VERDADERO
			zein	16569.2	1994.1	VERDADERO
			P-Glb1	13812.25	1980.5	VERDADERO
			zein	13827.1	2005.2	VERDADERO
SYN- IR604-5	mCry3A pmi MTL UbiZm1 nos	mCry3A pmi P-MTL P-UbiZm1 3' nos				

MON 87460-4	espB	espB	CaMV35s	10465.1	2038	VERDADERO
	nptII	nptII	P-Glb1	9866	2020.2	VERDADERO
	P-ract1	P-ract1	zein	10205.5	2012	VERDADERO
	CaMV35s	P-35S				
	nos	3' nos				
DAS 1507-1	Tr7	Tr7				
		I-rAct1				
	pat	pat	Eracl1	5310.6	1990.3	VERDADERO
	Cry1Fa2	Cry1F	P-Glb1	7020.5	1990.5	VERDADERO
	UbiZm1	P-UbiZm1	zein	8724	1985	VERDADERO
	CaMV35s	P-e35S				
	Orf25polyA	Orf25polyA				
	I-UbiZM1					
	3' 35S					

\*CERA. (2012). GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. <http://cera-gmc.org/GMCropDatabase>

\*\* Biosafety Scanner /Genetic Rights Foundation. Evaluation tool for the management and control of GMOs in crop production. <http://en.biosafetyscanner.org/index.php>

**Tabla XV.** Identificación por medio de secuenciación y BLAST (NCBI) de elementos transgénicos en muestras presentas en las laminillas A, B y C.

Laminilla	Muestra	Elemento	Identidad	E Value
A	Maíz sin modificación genética	P-Glb1	99%	3e-68
	Soya sin modificación genética	7s	100%	2e-101
	Soya sin modificación genética	P-Glb1	99%	6e-44
	Soya sin modificación genética	P-SAMS	90%	5e-41
B	Harina de trigo (H4)	tahsp17	100%	2e-49
	Harina de trigo (H5)	tahsp17	98%	7e-65



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Extracción de ADN

La extracción de una concentración de ADN de calidad es el primer y más importante paso para la detección de elementos transgénicos en alimentos procesados, debido a la degradación a la que son expuestos estos productos por factores químicos, físicos y enzimáticos durante su procesamiento, lo que puede llegar a afectar la precisión y la sensibilidad de la técnica empleada para su determinación.

En este trabajo, se logró obtener una concentración de ADN apropiada y de calidad de productos altamente procesados utilizando el método de CTAB con algunas modificaciones. Las cantidades de ADN variaron entre 70 a 2,802 ng/uL, y la relación 260/280 entre 1.68 a 2.0, confirmando la pureza de la extracción para realizar PCR. Otros estudios han utilizado el mismo método para extraer cantidades suficientes de ADN de productos procesados (Cardarelli *et al.*, 2005; Greiner & Konietzny, 2008; Arun & Yilmaz, 2011).

Dependiendo del procesamiento de cada alimento, el ADN extraído de las muestras puede no ser detectado en geles de agarosa, por lo que la cantidad de ADN puede ser insuficiente como templado para PCR multiplex. Por lo tanto, se recomienda que después de la extracción de ADN, este sea concentrado para alcanzar una concentración mayor de 50 ng/uL y amplificar fragmentos de ADN menores a 500 pb.

### 8.2 Diseño de Sondas y Cebadores

El diseño de las sondas con el programa OligoArray basado en el algoritmo BLAST, permitió calcular todos los alineamientos posibles de sondas complementarias a las secuencias sometidas de los elementos transgénicos. Aquellas sondas que reunieron el nivel necesario de especificidad fueron posteriormente evaluadas utilizando MFOLD (web server for nucleic acid folding and hybridization prediction), para determinar su

autocomplementariedad y el posible grado de formación de estructuras secundarias. Una vez asegurada la especificidad de cada sonda utilizando BLAST, el algoritmo seleccionó las sondas con la menor formación de estructuras secundarias que coincidieran con el rango de  $T_m$  definido (85-90°C). Otro factor importante durante el diseño de las sondas fue su longitud. En este trabajo, todas las sondas fueron diseñadas para tener un tamaño de 50 pb, esto con la finalidad de evitar la preferencia de los amplicones de PCR a sondas cercanas que presentaran una mayor longitud.

El tamaño de los amplicones de PCR es muy importante para la detección de elementos transgénicos. En este trabajo, los cebadores para la identificación de los elementos transgénicos fueron diseñados para generar amplicones menores a 250 pb, mientras que los cebadores para la identificación de promotores endógenos fueron diseñados para generar un amplicón menor a 500 pb con al menos 200 pb dentro de la región del promotor, esto con la finalidad de distinguir los promotores endógenos de ellos mismos cuando se encuentran en otra posición como genes exógenos. Además, se diseñaron con valores similares de  $T_m$  y contenido de GC (%).

### **8.3 Hibridación del Arreglo**

La hibridación con microarreglos es una técnica muy flexible en donde nuevas variedades de construcciones transgénicas pueden ser incluidas en el proceso de detección, simplemente añadiendo una nueva secuencia de ADN al arreglo. Sin embargo, la compatibilidad de los cebadores y la especificidad y sensibilidad de la hibridación entre los productos de PCR o moléculas blanco y las sondas, influyen simultáneamente la validación de los experimentos con microarreglos, es decir, la especificidad del proceso de hibridación es uno de los factores más importantes en la calidad de los resultados del microarreglo.

Algunos factores que afectan o influyen la especificidad de la hibridación han sido reconocidos y estudiados ampliamente (Dimitrov & Zuker 2004; Jayaraman *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Bar-Or *et al.*, 2007; Koltai, 2008.). De manera general, los principales factores que fueron considerados en este trabajo pueden dividirse en dos categorías, la

primera se refiere a las secuencias de las sondas y de los productos de PCR o moléculas blanco, y la segunda a la cinética de hibridación.

En cuanto a la complementariedad de las sondas con las moléculas blanco, las principales consideraciones incluyen:

- El tamaño de la sonda. Las sondas cortas tienen un mayor nivel de especificidad que aquellas más largas.
- El contenido de GC (%). Mientras mayor sea el contenido de GC mayor será el nivel de especificidad de la hibridación.
- La formación de estructuras primarias de la sonda. El aumento de la estabilidad termodinámica de las estructuras secundarias de la sonda reduce la especificidad de hibridación.
- La longitud y composición de la estructura formada durante la hibridación. la continuidad del apareamiento de las bases formadas entre la sonda y la molécula blanco aumenta la especificidad.
- Bases vecinas complementarias a lo largo de la sonda y la molécula blanco. Se ha demostrado que la energía libre de unión para una sonda y una molécula blanco es un efector importante en la especificidad de la hibridación.
- La posición de apareamiento y orientación de las bases entre la sonda y la molécula blanco. Los errores de alineación en el centro de las sondas son más discriminativos (tienen un mayor efecto en la especificidad) que aquellos errores en los extremos de las sondas. Sin embargo, sondas con segmentos complementarios a porciones en el extremo de la molécula blanco tienen mayor especificidad que aquellas que son complementarias a segmentos en la porción central de la molécula blanco.

La cinética de la hibridación depende principalmente de la cantidad de moléculas blanco presentes y de aquellas que no presentan complementariedad, la duración de la hibridación, prehibridación y la temperatura de hibridación, y por último de las soluciones de hibridación. Por lo tanto, la especificidad de la hibridación es influenciada por diversos

factores que se relacionan entre ellos y que se deben considerar para garantizar los mejores resultados del microarreglo.

#### **8.4 Validación del arreglo molecular**

En este estudio se realizaron tres hibridaciones con diferentes muestras, la primera hibridación (Figura 10, laminilla A; Tabla XII), se realizó con controles positivos tomados del laboratorio de Biología Molecular de Plantas y muestras de germinados de granos adquiridos en comercios locales de La Paz, B.C.S. Las muestras analizadas de controles positivos; PBI121 y alfalfa transgénica, presentaron los elementos esperados (CaMV35s y nptII), no se detectó al terminador NOS, presente en ambas muestras control, esto pudo deberse a que la  $T_m$  para los cebadores NOS es de 53°C y la reacción de PCR multiplex se corrió a 55°C, aunado a ello que durante una reacción múltiple los cebadores entran en competencia por lo que habría que considerar su eficiencia durante la reacción. Las muestras de semillas de maíz, soya, trigo y arroz adquiridas en distribuidoras locales, presentaron los promotores 7s, P-SAMS, TA29, el terminador tahsp17 y el gen de selección Bar, los cuales fueron confirmados por PCR punto final, confirmando que estas muestras contienen elementos transgénicos. Sin embargo, aunque Bar, TA29 y tahsp17 fueron detectados por PCR punto final, no fue posible su identificación por secuenciación. A pesar que el promotor P-Glb fue detectado e identificado por secuenciación en la muestra de maíz (Tabla XV), no puede asegurarse que se trate de un promotor exógeno ya que este elemento fue descartado para el diseño de sondas endógenas, al presentar más de 20 homologías con el genoma. Además, se detectó promiscuidad para las sondas endógenas de soya ESAMS2, ESAMS3, ESAMS5, las sondas Eract1y EGtl-1 de arroz, y zein de maíz. El gen endógeno de arroz SPS, se presentó en todas las muestras, por lo que podría utilizarse como sonda control de hibridación en posteriores trabajos.

En el segunda hibridación (Figura 10, laminilla B; Tabla XIII), se analizaron tres muestras de harina de trigo y dos muestras de harina de maíz de marcas comerciales que se distribuyen libremente en el mercado local. El promotor CaMV35s se detectó para las

harinas H1, H2, H3 y H5, sin embargo no fue posible confirmarlo por medio de PCR punto final. Se reafirmó que las sondas endógenas de soya ESAMS son promiscuas al ser detectadas en las muestras de harina, se confirmó la presencia del terminador tahsp17 en H4 y H5 por medio de secuenciación, y el gen de selección Bar en H4 únicamente por PCR punto final. Estos resultados coinciden con Mendoza *et al* 2006, quienes detectaron el promotor CaMV35s en tres productos derivados de maíz (granos, harinas y aceite) adquiridos en mercados mexicanos. Debido a que el 30% del maíz es importado desde Estados Unidos (UN Comtrade, 2012) es muy probable que la mayoría o una gran cantidad de los productos de maíz para consumo en México sean genéticamente modificados o se deriven de ellos. Aunque la Ley de Bioseguridad en México permite la comercialización y la venta de productos alimenticios sin un etiquetado pertinente sobre su origen, en base a los resultados de este estudio, se recomienda la implementación de sistemas efectivos de trazabilidad, así como un estricto monitoreo de la documentación correspondiente por las autoridades competentes.

En cuanto a la validación del arreglo con el análisis de seis construcciones transgénicas de patente, (Figura 10, laminilla C; Tabla XIV), la construcción MON 88913-8 de algodón presentó ocho elementos transgénicos ajenos a lo reportado en la patente y ante SENASICA, pero debido a la inespecificidad de los productos no fue posible confirmar su presencia por PCR punto final. El promotor CaMV35s se presentó en MON 88913-8, DAS 59122-7, SYN-BT011-1 y MON 87460-4. Los elementos E9, Cp4epsps, UbiZm1, Pat, PinII, NOS, Cry1Ab, MTL, Tr7, ract1, 3'35s presentes en las construcciones transgénicas no fueron detectados por el arreglo, sin embargo, en las pruebas de estandarización de temperaturas de amplificación para 3'35s, PinII, Tr7, E9 y cp4epsps (Figura 7) se observó que presentaron productos inespecíficos lo que podría indicar la inespecificidad de los cebadores y en consecuencia la no detección de estos elementos en el arreglo. Con la presente información, se establece que para seguir utilizando el microarreglo para transgénicos, es necesario modificar las condiciones de amplificación durante el PCR multiplex, mediante la estandarización de temperaturas para diversos grupos de cebadores y/o la adición de un mejorador (*enhancer*).

El uso de construcciones transgénicas que contienen promotores de plantas para la expresión de genes de interés, es cada vez más frecuente, por lo que fue indispensable identificar las secuencias endógenas de las introducidas artificialmente por ingeniería genética a maíz, soya, trigo y arroz. Esto requirió el diseño de sondas específicas que tomaran en cuenta parte del gen que de manera natural es regulado por el promotor (en base al análisis de genomas), logrando obtener 10 sondas (de 17 diseñadas) que efectivamente identifican cuándo el elemento detectado es endógeno y no transgénico. Las sondas que presentaron promiscuidad para la identificación de los elementos endógenos fueron: EGtl1, Eract1, SPS, ESAMS2, ESAMS3, ESAMS5 y zein, 5 sondas no funcionaron (NOS, E9, Tr7, MTL y cp4epsps) debido a que nunca se detectó fluorescencia en muestras control y 6 sondas de los elementos transgénicos GOX, Gtl1, TA29, Barnase, RAmy3A y7s no fue posible evaluarlas por no tener muestras transgénicas con éstos elementos dentro de sus construcciones.

De acuerdo a lo mencionado en apartados anteriores, estos problemas de reconocimiento inespecífico se solucionan mediante aumento en la temperatura de alineación en la PCR multiplex y la adición de betaína para algunos juegos de primers y estandarizando el proceso de hibridación para aumentar su astringencia.

## 9. CONCLUSIONES

El diseño de sondas a partir de secuencias derivadas de un análisis bioinformático de las regiones promotoras y terminadoras de los genomas existentes en las bases de datos, de construcciones comerciales de vectores de expresión y de construcciones experimentales, permitió el diseño de un arreglo molecular de ADN con 45 sondas capaces de identificar la presencia de elementos transgénicos. Un total de 33 sondas resultaron efectivas en la hibridación de los microarreglos acoplado a la técnica de PCR multiplex, permitiendo una aproximación rápida para la detección simultánea de elementos transgénicos en productos frescos y procesados. Así, mediante ésta herramienta se identificaron 4 granos y 2 harinas tomadas de comercios locales, que contienen elementos transgénicos (7s, P-SAMS, tahsp17) y se identificaron elementos transgénicos “no declarados” en algunas de las construcciones de patente.

El diseño del arreglo molecular de ADN para la identificación de transgénicos presenta la ventaja de poder incorporar eventualmente sondas que permitan mantenerlo actualizado para la identificación de nuevas variedades transgénicas apoyando el desarrollo de técnicas para el monitoreo y control de transgénicos.

## 10. LITERATURA CITADA

Arun O. O., Yilmaz, F. (2011). PCR detection of genetically modified maize and soya in mildly and highly processed foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), S96.

Bar-Or C., Czosnek, H., Koltai, H. (2007). Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity. *Trends Genet.*, 23, 200–207.

Bertheau Y., Dioloz A., Kobilinsky A., Magin K. (2002). Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. *Journal of AOAC International* 85:801-808.

Blais B.W., Phillippe L. M., Vary N. (2002). Cloth-based hybridization array system for detection of transgenic soy and corn by multiplex polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 17:1407–1411.

Bordoni R., Germini A., Mezzelani A., Marchelli R., Bellis G. (2005). A Microarray Platform for Parallel Detection of Five Transgenic Events in Foods: A Combined Polymerase Chain Reaction-Ligation Detection Reaction-Universal Array Method. *J. Agric. Food Chem.* 53, 912-918.

Cardarelli P., Branquinho M. R., Ferreira R. T. B., Da Cruz F. P., Gemal, A. L. (2005). Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food Control*, 16, 859-866.

Chen Y.A., Chou, C.C., Lu, X., Slate, E.H., Peck, K., Xu, W., Voit, E.O., Almeida, J.S. (2006). A multivariate prediction model for microarray cross-hybridization. *BMC Bioinformatics*, 7, 101.



Conceição F.R., Moreira A. N., Binsfeld P.C. (2004). Detección de organismos genéticamente modificados en alimentos e ingredientes alimentarios. *Ciencia Rural* 36:315-324.

Dimitrov R.A., Zuker,M. (2004). Prediction of hybridization and melting for double-stranded nucleic acids. *Biophys. J.*, 87, 215–226.

Dong Liu (2009). Design of Gene Constructs for Transgenic Maize. En: Scott M. P. (ed.), *Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize*, vol. 526. Humana Press, a part of Springer Science Business Media, USA.

Elenis D.S., D. P. Kalogianni, K. Glynou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos. (2008). Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem* 392:347–354.

Katovich E., (2012). The Regulation of Genetically Modified Organisms in Latin America: Policy Implications for Trade, Biosafety, and Development. Department of Applied Economics, University of Minnesota.

European Parliament and Council. (2003). *Off J Eur Communities* 268:1–23. [http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/legisl\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/legisl_en.htm)

FAO/OMS. (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology, Ginebra, Suiza, 29 de mayo-2 de Junio de 2000.

Freire E.C., Z.N. Brandão, (2006). Biotechnology of cotton in Brazil: legal and political impediments and their effects in the competitiveness of the Brazilian cotton. In: 65th plenary meetings ICAC, 2006, Goiania-GO. 65th plenary meetings ICAC. Goiania-Go: ICAC, 2006.

Greiner R., Konietzny, U. (2008). Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. *Food Control*, 19,499-505.

Hamels S, S. Leimanis, M. Mazzara, G. Bellochi, N. Foti, W. Moens, J. Remacle, G. Van den Eede. (2007). Microarray method for the screening of EU approved GMOs by identification of their genetic elements. JRC Scientific and technical reports.

Hamels S., Glouden T, Gillard K, Mazzara M, Debode F, Foti N, Sneyers M, Nuez TE, Pla M, Berben G, Moens W, Bertheau Y, Audéon C, Van den Eede G, Remacle J. (2009). A PCR-microarray method for the screening of genetically modified organisms. *Eur Food Res Technol* 228:531–541.

Holst-Jensen A, Rønning S.B., Løvseth A., Berdal K.G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem*, 375(8):985-993.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, (2010). Marcos regulatorios de bioseguridad y situación de las aprobaciones comerciales de Organismos Genéticamente Modificados en los países del Consejo Agropecuario del Sur, CAS/ IICA- 2da Edición- Santiago: IICA, CAS, REDPA, 2010. 84 p.

James C., (2009). Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2008. ISAAA Brief No. 39; International Service for the Acquisition of Agri- Biotech Applications (ISAAA): Ithaca, NY.

James C., (2013). Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications). Ithaca, NY. Brief 46

Jayaraman,A., Hall, C.K., Genzer, J. (2006). Computer simulation study of molecular recognition in model DNA microarrays. *Biophys. J.*, 91, 2227–2236.

Jiménez- Peralta M. (2003). Detección de alimentos y cultivos modificados genéticamente. Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Karakach T. K., Flight M. R., Douglas S. E., P. D. (2010). Wentzell. An introduction to DNA microarrays for gene expression analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 104: 28–52.

Khan S. J., Muafia S., Nasreen Z., Salariya A.M. (2012). Genetically modified organisms (GMOs): Food security or threat to food safety *Pakistan Journal of Science*. Vol. 64 No. 2.

Kim J. H., Kim S. Y., Lee H., Kim Y. R., Kim H. Y. (2010). An event-Specific DNA microarray to identify Genetically Modified Organisms in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6018-6026.

Leimanis S, Hernández M., Fernández S., Boyer F., Burns M., Bruderer S., Glouden T., Harris N., Kaeppli O., Philipp P., Pla M., Puigdomènech P., Vaitilingom M., Bertheau Y., Rémacle J. A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients (2006). *Plant Mol Biol* 61:123–139.

Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de marzo de 2005. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión.

Lino-Ferreira J., Magela de Almeida Cançado G., Borém A., Silva Gomes W., Alemu Setotaw T. (2010). Biosafety and Detection of Genetically Modified Organisms. Agricultural Research Agency of Minas Gerais - EPAMIG, Caldas – MG, Department of Crop Science, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Brazil.

López-Campos G., Martínez-Suarez J. V., Aguado-Urda M., López Alonso V. (2012). Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne. Pathogens, Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition.

Marmioli N., Maestri E., Gulli M., Malcevschi A., Peano C., Bordoni R., G De Bellis. (2008). Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem* 392:369–384.

Mendoza A., Fernández S., Cruz M. A., Rodríguez-Perez M. A., Resendez-Perez D., Barrera Saldaña H. A., (2006). Detection of genetically modified maize food products by the polymerase chain reaction detección de productos de maiz genéticamente modificados por la reacción en cadena de la polimerasa, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5:3, 175-181.

Pollew, D. (1999). Cauliflower Mosaic Virus Promoter: Potential Risks. Department of Plant Agriculture. University of Guelph.

Ramessar K, Capell T, Twyman R. M., Quemada H., Christou P. (2008). Trace and traceability a call for regulatory harmony. *Nat Biotechnol* 26:975–78.

Rudi K, Rud I., Holck A. (2003). A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res*, 31(11):e62.

Tengs T., Kristoffersen A. B, Berdal K. G., Thorstensen T., Butenko M. A., Nesvold H. , Holst-Jensen A. (2007). Microarray-based method for detection of unknown genetic modifications. *BMC Biotechnology*, 7:91.

Tuteja N., Verma S., Kumar Sahoo R., Raveendar S., Lingeshwara Reddy I. B. (2012). Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern. *J. Biosci.* 37(1), March 2012, 167–197. Indian Academy of Sciences.

United Nations Commodity Trade Statistics Database, Statistics Division, (2012). US Department of Agriculture. 2008. Audit report: controls over importation of transgenic plants and animals. Report no. 50601- 17-Te. US Department of Agriculture, Washington.

Von Götz F. (2010). See what you eat—broad GMO screening with microarrays. *Anal Bioanal Chem.* 396:1961-1967.

Zhang Y.P., Uyemoto J.K., Kirkpatrick B.C. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J Virol Methods*. Mar;71(1):45-50.

Zhou P. P., Zhang J. Z., You Y. H., Wu Y. N. (2008). Detection of genetically modified crops by combination of multiple PCR and low-density DNA microarray. *Biomedical and environmental sciences*. 21: 53-62.

**Anexo 1.** Características de los promotores y terminadores seleccionados.

<b>Promotores</b>						
<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Zea mays</b>	<b>Glycine max</b>	<b>Triticum aestivum</b>	<b>Oryza sativa</b>	<b>Observaciones</b>
<b>CaMV35s</b>	Constitutive promoter of the 35S Cauliflower Mosaic Virus	Bt176 Bt11 MON810 T25 DAS 59122-7 NK603 3272 TC1507 676 678 680 Bt10 CBH-351 DBT418 DLL25 (B16) MON80100 MON802 MON809 MON832 MON87460 MON88017 MON89034 MS3 MS6 TC-6275	GTS 40-3-2 A2704-12 W98 GU262 W62	MON71800	LLRice601	
<b>ract1</b>	Constitutive promoter of Oryza sativa actin gene	NK603 GA21 MON87460 MON88017		MON71800	GM Shanyou 63 Huahui-1	Monsanto (maíz) B.C.S, Chihuahua,

									Nayarit, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas Durango.
<b>MTL</b>	Promoter of metallothionein-like gene from Zea mays mainly expressed in roots	MIR604							Syngenta (Maiz) Sinaloa y Tamaulipas
<b>P-SAMS</b>	Constitutive promoter of S-adenosyl-L-methionine synthetase gene from Glycine max		DP356043 DP-305423						Dupont (Soya) Nayarit
<b>UbiZm1</b>	Constitutive promoter of ubiquitin 1 gene from Zea mays	DAS 59122-7 MIR604 TC6275 3272 TC1507 98140 TC-6275							
<b>TA29</b>	Anther- specific plant promoter from Nicotiana tabacum	MS3 MS6							NOS and 35S
<b>Glb1</b>	Promoter of globulin 1 gene from Zea mays	LY038 BVLA43010 1							Unico promotor en ambos eventos
<b>FMV</b>	Constitutive promoter of Figwort Mosaic Virus	MON89034							35S and NOS
<b>FMV/Tsfl</b>	Chimeric constitutive promoter of Tsfl gene from Arabidopsis thaliana fused to the enhancer sequences from the 35S promoter from the FMV		MON89788 MON87705						Monsanto (algodón y soya)

<b>Zein</b>	Zein protein precursor gene from Zea mays cultivar A5707	3272				35s, UBI and NOS
<b>Gtl-1</b>	Oryza sativa glutelin 1 gene				United States Patent 7192774	Sin arroz genéticamente modificado
<b>RAmy3A</b>	Alpha-amylase promoter from Oryza sativa				WO 1998042853 A1	Sin arroz genéticamente modificado
<b>7S <math>\alpha'</math></b>	Seed specific promoter from Sphas1 gene encoding beta-conglycinin storage protein ( $\alpha'$ -bcsp) of Glycine max		MON 87769			Monsanto (soya)



Terminadores						
Nombre	Descripción	Zea mays	Glycine max	Triticum aestivum	Oryza sativa	Observaciones
NOS	Nopaline synthase terminator	Bt11 MON863 NK603 MIR604 3272 GA21 Bt10 CBH-351 MIR162 MON80100 MON802 MON809 MON832 MON88017 MON89034 MS3 MS6 MON71800 MON87460	GTS 40-3-2		LLRice601 GM Shanyou 63 Huahui-1	
3' 35S	Termination sequence of the CaMV35S gene	MIR162 TC1507 59122 3272 T25 T14	A2704-12 A5547-127 A5547-35 A2704-21		TAROM MOLAI1	
tahsp 17	Termination sequence of wheat heat shock 17 gene	MON863 MON89034 MON88017				Monsanto (Maiz)
pinII	Termination sequence of proteinase inhibitor II gene from Solanum tuberosum	DAS 59122-7 TC6275 676 678 680 98140 DBT418 DP32138-1 TC-6275	DP356043			Maiz y soya
Glb1	Termination sequence of globulin 1 gene from Zea mays	GA21 LY038				Maiz

		BVLA430101						
<b>E9</b>	Termination sequence from pea (Pisum sativum) rbcS E9 gene			MON 87769 MON89788 MON87705				Monsanto (Soya)
<b>Tr7</b>	Termination sequence from T- DNA of A. tumefaciens	DBT418 DLL25 (B16) MON87460						Monsanto (Maiz)

**Anexo 2.** Características y secuencia de 33 sondas para la identificación de 13 promotores, siete terminadores, siete genes de selección y cinco genes endógenos de referencia.

Nombre	bp	E ds DNA	Entalpía	Entropía	Tm
CaMV35s	50	-328.42	-398.19	-1073.4	87.66
raclI	50	-322.65	-391.49	-1059.1	86.25
MTL	50	-333.63	-404.69	-1093.3	87.06
P-SAMS	50	-327.88	-398.09	-1080.2	85.36
UbiZm1	50	-335.86	-407.29	-1099	87.54
TA29	50	-329.22	-399.79	-1085.8	85.09
P-Glb1	50	-339.17	-410.9	-1103.4	89.32
FMV	50	-328.03	-398.19	-1079.4	85.71
FMV/Tsfl	50	-322.46	-391.49	-1062	85.29
Zein	50	-331.88	-402.69	-1089.4	86.52
Gdt-1	50	-329.57	-400.19	-1086.6	85.19
RAmy3A	50	-339.31	-410.89	-1101.3	89.99
7S Î±'	50	-322.6	-391.59	-1061.4	85.58
NOS	50	-327.75	-397.99	-1080.7	85.11
3Â'35S	50	-328.62	-398.99	-1082.7	85.36
tahsp 17	50	-331.37	-401.99	-1086.6	86.8
pinII	50	-326.8	-396.09	-1066.1	88.15
T-Glb1	50	-325.72	-395.39	-1071.89	85.61
E9	50	-327	-396.99	-1076.9	85.44
Tr7	50	-326.9	-396.89	-1076.8	85.38
Bar	50	-340.3	-412.09	-1104.6	89.99
Pat	50	-330.56	-400.79	-1080.5	87.7
Gox	50	-337.67	-408.89	-1095.8	89.99
barnase	50	-329.35	-399.69	-1082.3	86.12

<b>nptII</b>	50	-327.01	-396.3	-1066	88.36
<b>ep4epsps</b>	50	-334.17	-404.7	-1085	89.74
<b>CryIAb</b>	50	-335.27	-405.99	-1088	89.93
<b>rbcl</b>	50	-324.71	-394.19	-1069	85.47
<b>zein</b>	50	-331.46	-401.69	-1080.5	88.51
<b>lectin</b>	50	-336.09	-407.09	-1092.4	89.48
<b>SPS</b>	50	-330.19	-399.89	-1072.4	89.53
<b>PRP</b>	50	-321.44	-390.29	-1059.3	85.08
<b>E. coli spp</b>	50	-324.59	-393.69	-1063.1	86.94

**Anexo 3.** Características y secuencias de 12 sondas adicionales para la identificación de nueve promotores endógenos.

Hit	Cromosoma	bp	E ds DNA	Entalpía	Entropía	Tm
<b>Glycine max</b>						
P-SAMS1	gi 283570567 gb CM000840.1	50	-329.46	-400.09	-1086.7	85.07
P-SAMS2	gi 283570557 gb CM000850.1	50	-329.09	-399.59	-1084.7	85.26
P-SAMS3	gi 283570557 gb CM000850.1	50	-325.77	-395.59	-1074.3	85.01
P-SAMS4	gi 283570559 gb CM000848.1	50	-324.92	-394.39	-1068.9	85.68
P-SAMS5	gi 283570555 gb CM000852.1	50	-325.68	-395.49	-1074	85.02
P-SAMS6	gi 283570571 gb CM000836.1	50	-326.23	-395.49	-1065.6	87.77
P-SAMS8	gi 283570564 gb CM000843.1	50	-327.75	-397.49	-1073	87.16
7s1	gi 283570554 gb CM000853.1	50	-322.6	-391.59	-1061.4	85.58
7s2	gi 283570554 gb CM000853.1	50	-324.06	-393.49	-1068.2	85.09
<b>Oryza sativa</b>						
Gtl-1	gi 255679158 dbj AP008216.2	50	-328.5	-398.59	-1078.4	86.39
IRAmy3A	gi 255678666 dbj AP008215.2	50	-328.08	-397.59	-1069.4	88.43
ract1	gi 255674134 dbj AP008209.2	50	-331.09	-401.19	-1078.5	88.71

**Anexo 4.** 66 Cebadores diseñados para la amplificación de las sondas de 13 promotores, siete terminadores, siete genes de selección, cinco genes endógenos de referencia y un gen como control negativo.

Nombre	Primer	Tamaño	Tm	GC%	any	3'	Tamaño amplicón (pb)
<b>CaMV35s</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	4	2	150
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	4	1	
<b>ract1</b>	LEFT PRIMER	19	69.5	57.89	3	1	156
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	3	0	
<b>MTL</b>	LEFT PRIMER	20	58.4	50	3	2	206
	RIGHT PRIMER	24	61.8	41.67	3	0	
<b>P-SAMS</b>	LEFT PRIMER	20	62.5	60	4	2	188
	RIGHT PRIMER	20	62.5	60	3	0	
<b>UbiZm1</b>	LEFT PRIMER	19	57.3	52.63	4	2	249
	RIGHT PRIMER	27	57.7	22.22	4	1	
<b>TA29</b>	LEFT PRIMER	21	55.5	38.1	4	0	205
	RIGHT PRIMER	21	59.4	47.62	5	1	
<b>P-Glb1</b>	LEFT PRIMER	21	61.3	52.38	3	2	150
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	3	1	
<b>FMV</b>	LEFT PRIMER	20	68.4	50	6	2	249
	RIGHT PRIMER	20	60.5	55	4	2	
<b>FMV/Tsfl</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	3	0	249
	RIGHT PRIMER	20	52.3	35	6	0	
<b>Zein</b>	LEFT PRIMER	22	56.6	36.36	8	1	195
	RIGHT PRIMER	20	56.4	45	4	1	
<b>Gtl-1</b>	LEFT PRIMER	22	60.3	45.45	5	2	242
	RIGHT PRIMER	20	56.4	45	3	0	
<b>RAmy3A</b>	LEFT PRIMER	20	56.4	45	7	2	165
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	4	2	
<b>7S <math>\alpha'</math></b>	LEFT PRIMER	20	56.4	45	2	1	203
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	3	1	
<b>NOS</b>	LEFT PRIMER	19	53.0	42.11	6	2	212
	RIGHT PRIMER	21	53.5	33.33	6	0	
<b>3'35S</b>	LEFT PRIMER	18	58.4	61.11	4	2	205
	RIGHT PRIMER	25	57.6	28	4	2	
<b>tahsp 17</b>	LEFT PRIMER	20	58.4	50	4	2	150
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	4	2	
<b>pinII</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	4	1	209
	RIGHT PRIMER	20	56.4	45	4	2	
<b>T-Glb1</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	4	2	153
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	4	0	
<b>E9</b>	LEFT PRIMER	23	61.1	43.48	5	3	212
	RIGHT PRIMER	22	56.6	36.36	6	2	
<b>Tr7</b>	LEFT PRIMER	26	63.2	38.46	5	0	177
	RIGHT PRIMER	19	59.5	57.89	4	3	

<b>Bar</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	4	0	156
	RIGHT PRIMER	18	60.7	66.67	3	1	
<b>Pat</b>	LEFT PRIMER	20	58.4	50	4	2	243
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	4	2	
<b>Gox</b>	LEFT PRIMER	20	58.4	50	5	3	238
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	6	2	
<b>barnase</b>	LEFT PRIMER	20	56.4	45	3	2	228
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	2	0	
<b>nptII</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	5	3	249
	RIGHT PRIMER	20	60.5	55	4	2	
<b>cp4epsps</b>	LEFT PRIMER	22	58.4	40.91	3	3	206
	RIGHT PRIMER	19	57.3	52.63	4	2	
<b>Cry1Ab</b>	LEFT PRIMER	20	62.5	60	5	1	235
	RIGHT PRIMER	20	60.5	55	2	0	
<b>rbcl</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	2	1	184
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	5	0	
<b>zein</b>	LEFT PRIMER	20	58.4	50	6	2	209
	RIGHT PRIMER	20	58.4	50	7	2	
<b>lectin</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	6	2	205
	RIGHT PRIMER	20	56.4	45	5	1	
<b>SPS</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	4	3	240
	RIGHT PRIMER	20	56.4	45	4	2	
<b>PRP</b>	LEFT PRIMER	20	60.5	55	6	2	205
	RIGHT PRIMER	22	56.6	36.36	4	0	
<b>Ecolispp</b>	LEFT PRIMER	20	58.4	50	3	1	199
	RIGHT PRIMER	20	56.4	45	3	2	

**Anexo 5.** 16 cebadores adicionales para la detección de las sondas colocadas entre la región del promotor y el gen que regulan.

Nombre	Hit	Cromosoma	Primer	len	tm	GC%	any	3'	Fracción en Gen	Fracción en Promotor	Tamaño amplicón
<b>P-SAMS</b>	1	gi 283570567 gb CM000840.1	Right primer	20	60.5	55	3	1	164	307	471
	2	gi 283570557 gb CM000850.1	Right primer	22	60.3	45.45	4	2	82	314	396
<b>P-SAMS</b>	3	gi 283570557 gb CM000850.1	Left primer	20	58.4	50	5	1	159	337	496
			Right primer	21	57.4	42.86	6	1			
<b>P-SAMS</b>	4	gi 283570559 gb CM000848.1	Left primer	20	58.4	50	6	2	88	352	440
			Right primer	20	56.4	45	2	0			
<b>P-SAMS</b>	5	gi 283570555 gb CM000852.1	Left primer	20	58.4	50	6	2	116	355	471
			Right primer	26	61.6	34.62	5	0			
<b>P-SAMS</b>	6	gi 283570571 gb CM000836.1	Left primer	20	58.4	50	6	2	50	355	405
			Right primer	20	58.4	50	3	3'			
<b>P-SAMS</b>	8	gi 283570564 gb CM000843.1	Left primer	20	58.4	50	6	2	139	347	486
			Right primer	21	55.5	38.1	7	3'			
<b>7s</b>	1	gi 283570554 gb CM000853.1	Right primer	20	56.4	45	3	0	30	271	301
<b>7s</b>	2	gi 283570554 gb CM000853.1	Left primer	20	56.4	45	5	3	68	212	280
			Right primer	20	58.4	50	8	1			
<b>Gtl-1</b>	1	gi 255679158 dbj AP008216.2	Left primer	19	57.3	52.63	2	0	65	256	321
<b>RAmy3A</b>	1	gi 255678666 dbj AP008215.2	Right primer	20	56.4	45	5	1			
			Right primer	20	58.4	50	4	0	54	200	254
<b>ract1</b>	1	gi 255674134 dbj AP008209.2	Right primer	20	60.5	55	3	0	144	287	431