

DetECCIÓN e identificación molecular de eventos asociados a organismos vivos modificados en semillas de soya (*Glycine max* L.) en Venezuela

Luis A. Díaz^{1*} e Iván Galindo²

¹Oficina Nacional de Diversidad Biológica, Ministerio del Ecosocialismo y Aguas. Caracas, D.C. Venezuela

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

RESUMEN

La soya transgénica tolerante al glifosato es uno de los organismos vivos modificados (OVM) más distribuidos a escala mundial. Venezuela es un país importador de materias primas y productos procesados de países en donde el uso de OVM es una práctica común, como ocurre en países del Mercosur, lo que plantea la posibilidad de importar semilla de soya (*Glycine max* L.), o que algunos granos importados pudieran usarse como semillas. Por tales razones, se procedió a evaluar la presencia de secuencias asociadas a OVM en semillas de soya. Las muestras seleccionadas para este estudio representaron al 100% de los materiales empleados en las zonas productoras de soya, en el ciclo de siembra de 2010, registrados como cultivares elegibles en el Servicio Nacional de Semillas, constituido por cinco cultivares comerciales y dos cultivares empleados por pequeños agricultores del oriente del país. A las muestras, se les realizó la extracción del ADN para detectar el gen de la lectina de soya (gen endógeno), después se aplicó la estrategia de detección primaria empleando secuencias de cebadores que anclaron en la región común a varias secuencias transgénicas (P35S y TNOS). De esa evaluación, se obtuvo que una de las muestras resultó positiva para ambas secuencias, motivo por el cual se procedió a realizar un ensayo de laboratorio para identificar el evento específico GTS 40-3-2, corroborándose en tales ensayos que dicha semilla es tolerante al glifosato. Se tiene así el primer registro en Venezuela del uso de semillas de OVM en el cultivo de soya.

Palabras clave: cebadores, lectina, semillas, transgénicos

Molecular detection and identification of events associated to living modified organism in soybean seeds (*Glycine max* L.) in Venezuela

ABSTRACT

Transgenic glyphosate-resistance soybean is one of the most distributed living modified organism (LMO) worldwide. Venezuela is an important marketplace for imported raw materials and processed food products from countries where the use of LMO is a common practice, such as the Mercosur member states, which raises the possibility of importing soybean (*Glycine max* L.) or that some imported grains could be used as seeds. For these reasons, the presence of DNA sequences associated to LMO in soybean (*Glycine max* L.) seeds was evaluated. The samples selected for this study represented 100% of soybean cultivars planted in 2010, registered as eligible cultivars in the National Service of Seeds, constituted by five commercial cultivars and two noncommercial materials used by farmers at the west of the country. The samples were then subjected to DNA extraction to detect the gene for soybean lectin (endogenous gene), after that, primary screening strategy was applied using primer sequences that anchored in the region common to several transgene sequences (35S gene promoter and NOS gene transcription terminator). From this evaluation,

*Autor de correspondencia: Luis A. Díaz

E-mail: alexanderdiazm7@gmail.com

it was found that one of the seed samples was positive for both target sequences, for this reason, a laboratory assay was performed to identify the specific event GTS 40-3-2, confirming that the seed is tolerant to glyphosate. This is the first report in Venezuela confirming the use of LMO soybean seeds.

Key words: primer, lectin, seeds, transgenic

INTRODUCCIÓN

Los humanos han manipulado los genes desde el inicio de la agricultura, lo que ha variado con el paso del tiempo son las técnicas de modificación genética (Gepts, 2002). Con el transcurrir del tiempo nace la ingeniería genética y con ella los organismos vivos modificados (OVM), organismos modificados genéticamente (OMG) o transgénicos, los cuales son definidos por la Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2000), como “cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna”.

Los cuatro cultivos biotecnológicos que ocupan mayor superficie sembrada en el mundo son la soya, el maíz, el algodón y la canola. También, en dicho período, el número de países que adoptaron los cultivos biotecnológicos han ascendido significativamente, motivo por el cual se señala que esta industria ha crecido de manera exponencial y en la actualidad es uno de los sectores económicos más estables en el mundo (James, 2014).

Los principales países productores de OVM en el mundo son EEUU, Brasil, Argentina e India. Del total de países productores, 60% están ubicados en América, los cuales aportan un área mayor a 130 millones de hectáreas, que representan el 88% de la producción mundial de OVM, discriminados en 52% para EEUU y Canadá y 36% ubicados en América Latina (James, 2014). Por esto se señala que el continente americano es una zona abiertamente a favor de la producción de OVM.

Es conocido que la industria biotecnológica está en manos de pocas empresas desarrolladoras de este tipo de tecnologías (Brugés, 2005), motivo por el cual es importante detectar eventos transgénicos, ya sea para evitar la utilización de la tecnología sin pagar los privilegios por derechos de propiedad intelectual o para aplicar las reglamentaciones que cada país impone sobre el uso de OVM y sus derivados.

Actualmente la legislación venezolana prohíbe el uso de OVM producidos por empresas transnacionales (Acuerdo con Motivo del Día Internacional de la Diversidad Biológica, 2008). También se indica que el Estado ha establecido diversos tratados de cooperación e intercambio agrícola, siendo uno de los más significativos el Mercosur, en donde se tiene previsto la realización de importantes transacciones económicas directas,

en materia agrícola, con Argentina, Brasil y Uruguay, entre otros, países en los que la utilización y producción de OVM es una práctica común.

También se resalta el hecho de que las autoridades aduanales no tienen las capacidades para realizar las pruebas de detección de OVM a las materias primas y/o productos procesados, que son importados al país (Miranda, 2005). En consecuencia, es altamente probable que los OVM se encuentren en cualquier eslabón de la cadena agroproductiva del país.

Por las razones anteriores, el objetivo de la presente investigación fue detectar e identificar molecularmente eventos asociados a OVM en semillas comerciales de soya en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y obtención de las semillas objeto de estudio

Para la selección de los materiales de estudio, se revisó la base de datos de los cultivares elegibles de soya del Servicio Nacional de Semillas (Senasem), para el período de siembra 2009-2010 en Venezuela. Las muestras seleccionadas representaron al 100% de los cultivares empleados en las zonas productoras de soya, en el ciclo de siembra de 2010, las cuales están concentradas hacia el oriente del país (Cuadro 1). Dichas muestras fueron donadas por el Senasem, y las mismas fueron obtenidas como parte de las actividades realizadas en el marco de un convenio realizado entre Venezuela y Brasil. Adicionalmente, fueron colectadas muestras categoría “común”, donadas por el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), siendo estos materiales empleados por pequeños productores de soya del país, en sistemas de producción tradicional.

Cabe resaltar que la información sobre las personas naturales o jurídicas, públicas o privadas, así como los nombres de los cultivares comerciales que se evaluaron en esta investigación, será tratada confidencialmente, pues en la actualidad está prohibido en Venezuela el uso de semillas OVM para liberación al ambiente, o cualquier otro tipo de empleo (Briceño *et al.*, 2003), y además no corresponde con los objetivos del presente trabajo.

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

Categoría de clasificación en el laboratorio	Origen	Año de liberación
Control negativo	Costa Rica / Venezuela	2007
Control detectable	Argentina ¹	n/a ²
Muestra comercial 1	Brasil	2007
Muestra comercial 2	Brasil	2007
Muestra comercial 3	Venezuela	2009
Muestra comercial 4	Brasil	2007
Muestra comercial 5	Brasil	2005
Muestra común 1	n/a	n/a
Muestra común 2	n/a	n/a

¹ Harina de material modificado genéticamente proveniente de la República Argentina, en un convenio realizado entre el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) y el Laboratorio de Detección de OMG del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INTA).

² n/a: no aplica

Para la toma de la muestra, se procedió a la selección aleatoria de los sacos, los cuales se encontraban debidamente sellados y etiquetados con el nombre del material comercial, obtentor y origen, entre otros (ISTA, 2003; ISO, 2006a). Se muestrearon de 5 a 6 sacos por cultivar comercial y por estiba, los cuales fueron seleccionados en forma de zigzag. En cada uno de ellos se introdujo un calador, previamente limpio de restos de granos/semillas de otras especies y de otros lotes de soya muestreados, con el orificio hacia abajo, por una de las esquinas.

Se trató en todos los casos de alcanzar la otra esquina del saco, en forma diagonal, y en dirección ascendente formando un ángulo aproximado de 30°. Posteriormente se giró lentamente hasta presentar los orificios hacia arriba y se golpeó suavemente para facilitar la entrada de las semillas. Finalmente se extrajo el calador, teniendo la precaución de evitar derramar la muestra. Cada vez que el calador era introducido, se trataba de extraer submuestras de 300 a 400 g por saco, con las cuales se armaron los lotes de semillas de 2 kg aproximadamente, para finalmente empacarse en bolsas de papel con su debida identificación. Los orificios abiertos con el calador fueron sellados con ayuda de una etiqueta.

Ejecución de las pruebas de laboratorio

Las semillas muestreadas se trasladaron al Laboratorio de Detección y Cuantificación de OMG, adscrito a la Dirección de Agricultura y Soberanía Alimentaria del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación, en donde se aplicaron las metodologías de detección molecular de transgénicos.

Preparación de las muestras de laboratorio

Para la molienda de las muestras de soya se utilizó un molinillo eléctrico comercial, marca Moulinex®, con una capacidad de 300 g por carga. Dicha labor se inició

con la limpieza del molinillo con un paño humedecido en una solución de etanol al 70% (tres veces), y una vez con hipoclorito de sodio al 3,5% de ingrediente activo. Finalmente, el molinillo se limpió con papel secante, el cual era descartado. Este protocolo de limpieza se realizó entre muestras y al finalizar la molienda.

Se inició el procedimiento, moliendo las muestras de soya por tandas en función de la capacidad del molinillo, el control negativo, para posteriormente respetar el orden creciente de numeración indicado en el Cuadro 1. Entre muestra y muestra se realizó la limpieza del molinillo según el procedimiento ya descrito y en cada tanda era colectado el polvo más fino, el cual quedaba adherido en las paredes de la recámara del equipo, que se transfería a un vaso plástico desechable con la ayuda de una espátula esterilizada, para luego ser homogeneizada y almacenada en un tubo estéril de 50 mL.

De ahí se separaron cinco submuestras, de las cuales dos muestras de 5 g de harina de soya se colocaron en vasos plásticos descartables con el fin de realizar los inmunoensayos de evaluación directa, dos muestras fueron colocadas en dos viales, llenando los mismos hasta la marca de 100 uL, que serían empleados en las pruebas de detección de transgenes basadas en ADN y una última muestra se agregó en un vial totalmente lleno y se almacenó a temperatura ambiente en el laboratorio.

Aplicación de las tiras de flujo lateral

Las tiras de flujo lateral son una prueba de inmunoensayo que se emplea para conocer de forma cualitativa la existencia de OVM (Stave, 2002). Para ello, se usaron las tiras desarrolladas por la empresa Strategic Diagnostic Inc. (Trait®) de EEUU, para evaluar el evento de transformación transgénica GTS 40-3-2 relacionado con la tolerancia al herbicida glifosato, el cual es comercializado como soya "Round up Ready®".

Las muestras de análisis para esta metodología de detección, se obtuvieron agregando a las muestras 14 mL de agua destilada esterilizada y se agitó vigorosamente hasta obtener una mezcla consistente. En esta suspensión se introdujo la tira y se esperó a que fluyera el líquido por la misma, hasta observar que la banda control se coloreara. Luego se extrajeron de la mezcla, se secaron con papel secante y se compararon con el patrón de referencia disponible en el kit. La aparición de una línea (control) fue indicativo de que la prueba se desarrolló de manera adecuada, que las tiras funcionaron bien y que el cultivar podía considerarse negativo para el evento GTS 40-3-2, mientras que la aparición de dos bandas es indicativo de un resultado positivo (Quirasco *et al.*, 2004).

Ensayos de laboratorio basados en ADN

Las pruebas basadas en ADN se realizaron por duplicado, empleando métodos de detección no normalizados por la International Standardization Organization (ISO, 2005). Las pruebas se realizaron aplicando el esquema doble ciego. En todas las pruebas de este tipo, se utilizó un control negativo para el transgén, que corresponde a una soya producida por mejoramiento genético tradicional en Venezuela, un control negativo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reemplazando el ADN molde por agua, un control negativo de la especie específica (ADN de maíz) para el caso del gen endógeno de la lectina de soya, y un control detectable de transgénico proveniente de un ADN extraído a partir de una harina de soya donada por el Laboratorio de Detección de OMG, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), ente adscrito al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Argentina.

Extracción y cuantificación del ADN

La extracción del ADN de las muestras se realizó mediante el uso del kit comercial Nucleospin, desarrollado por Macherey Nagel® de Alemania (Tengel *et al.*, 2001). Se comprobó la cantidad y calidad del ADN obtenido tal como se encuentra descrito en el procedimiento de laboratorio propuesto por Tenggel *et al.* (2001).

Aplicación de la PCR en tiempo final para la amplificación del gen endógeno de soya y para la estrategia general primaria de detección del P35S y TNOS

Inicialmente se aplicó una prueba de detección para amplificar por PCR convencional un fragmento de ADN asociado con un gen específico de copia única de la lectina de soya. Posteriormente se procedió a estudiar las secuencias asociadas a varios eventos de transformación transgénica, evaluando las secuencias del P35S y de TNOS (Cuadro 2).

Las condiciones de reacción de la PCR y los programas del termociclador se variaron de acuerdo con el blanco de detección de interés, como se indica en los Cuadros 3 y 4. La detección de TNOS se realizó mediante una modificación de la investigación de Thion *et al.* (2002), con el fin de obtener mayor cantidad de producto de PCR y minimizar el efecto de los dímeros de cebadores. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2,5% (m/v), preparados con búfer TBE al 1%, pH 8,3, se observaron y fotografiaron en un sistema de fotodocumentación Gel Doc (BioRad).

Cuadro 2. Cebadores empleados para evaluar las secuencias asociadas con el gen endógeno de soya y la estrategia general primaria de detección del P35S y TNOS

Método de detección	Blanco	Cebador	Secuencia 5'@3'	TA ¹ (°C)	TAP ² (pb)	Referencia
Especie específica	Endógeno	TM LEC F TM LEC R	TCCACCCCCATCCACATTT GGCATAGAAGTTGAAGGA	60	81	Nikolic <i>et al.</i> (2008)
Estrategia general primaria	P35S	P35S – U P35S – L	GCTCCTACAAATGCCATCAGATAGT GATAGTGGGATTGTG CGTCA	60	195	Lipp <i>et al.</i> (1999)
		TNOS	NOS – A NOS – D	GAATCCTGTTGCCGGTCTTGCG GCGGGACTCTAATCATAAAAACCC	63	127

¹ TA: Temperatura de alineamiento

² TAP: Tamaño del producto amplificado

Cuadro 3. Condiciones de reacción de la PCR en tiempo final según el blanco de detección. Volumen final: 25 μ L

Componente	Blanco de detección		
	Endógeno	P35S	TNOS
Búfer		1X	
MgCl, mM	4	4	1,25
Cebador, μ M	0,2	0,5	0,5
dNTP, μ M		0,2	
Taq, U		0,625	
DMSO, %		5	
ADN, η g		\approx 200	

Detección del evento específico GTS 40-3-2, por PCR en tiempo final y real

Para identificar el evento específico de transformación GTS 40-3-2, se realizó una PCR convencional y una PCR en tiempo real, sólo a aquella muestra detectada para P35S y TNOS, tomando en consideración lo indicado en la investigación de Cazzola y Petruccelli (2006) para la PCR convencional y de acuerdo con en el kit comercial Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I de Roche®, para la PCR en tiempo real.

Las secuencias de los cebadores empleados para la detección del evento específico de transformación, en ambas estrategias fueron las siguientes: 5'ATCCCAC-TATCCTTTCGCAAGA3' (forward) y 5'TGGGG-TTTATGGAAATTGGAA3' (reverse), con una temperatura de alineamiento de 58°C y un producto de amplificación de 169 pb. Las condiciones del programa de PCR del kit comercial fueron utilizadas como lo señala su manual de procedimiento. Según esta metodología, se señalaron como detectadas aquellas muestras con presencia de un pico de Tm en el rango característico y con un Ct < a (Ct del control +2) (Corbisier *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiras de flujo lateral

Todas las bandas se tiñeron en la sección del control de detección, lo cual señala que la prueba se aplicó de manera correcta y las tiras estaban aptas de usar. También se pudo observar que ninguno de los cultivares de soja resultó detectado para el evento de transformación GTS 40-3-2. Este resultado "falso positivo" se atribuye en buena parte a que las semillas generalmente son sometidas a temperaturas que superan los 50°C con el fin de disminuir la humedad de campo a la humedad apropiada de comercialización (AOSA, 1985).

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

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	95	5
Desnaturalización	95	0,5
Alineamiento	60 E ¹ ; P35S 63 TNOS	0,5
Amplificación	72	0,5
Amplificación final	72	5

¹E: endógeno

Evidentemente este tratamiento térmico incide en la desnaturalización de la proteína CP4 EPSPS y por tanto en su estructura, afectando el reconocimiento antígeno/anticuerpo en la tira de flujo lateral (Van Duijn *et al.*, 2002). Por ello esta metodología no es recomendable de aplicar en materiales con cierto grado de procesamiento, como es el caso de las semillas comerciales. Sin embargo, se indica que las tiras de flujo lateral son un método reproducible, ya que se obtuvieron similares resultados analíticos independientes, bajo las mismas condiciones, por distintos analistas (Lipp *et al.*, 2000).

Extracción de ADN de las muestras de soja

En la Figura 1 se detalla que el rendimiento, la integridad y calidad del material genético extraído permitió obtener ADN sin degradaciones para la realización de las pruebas moleculares de detección de transgenes. Ello indica que el tratamiento térmico aplicado a la semilla modifica la estructura de la proteína transgénica, más no la naturaleza del ADN. De esta manera, debido

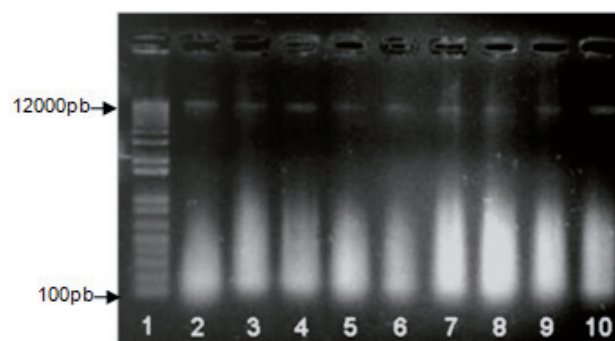


Figura 1. Análisis de la calidad de ADN de las muestras de semilla de soja objeto de estudio, en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de ADN 1 kb plus (Invitrogen), carril 2: Control negativo, carril 3: Control detectable, carriles 4 al 9: Muestras comerciales 1 al 5, carriles 9 y 10: Muestras común 1 y 2.

al poco procesamiento de las muestras se recomienda utilizar el kit comercial desarrollado por Macherey Nagel®, ya que así se estandarizan las condiciones entre los laboratorios en cuanto a la extracción de ADN, favoreciendo el cumplimiento de los requisitos reglamentarios internacionales (Di Bernardo *et al.*, 2007).

Evaluación del gen endógeno

Como se aprecia en la Figura 2, en ambas repeticiones, se logró amplificar de manera específica el gen endógeno de referencia asociado con la lectina de soya, tal y como se esperaba sólo en las muestras de soya y no en los controles de reacción de la PCR. Ello indica que se estableció correctamente la identidad de la soya mediante la evaluación del gen de copia única de la lectina de soya (Cazzola y Petruccelli, 2006); también se desprende de la evaluación de los controles de reacción que los reactivos de PCR funcionaron de manera adecuada.

Por otra parte, se puede asegurar que el procedimiento de extracción permitió obtener un ADN de longitud, pureza e integridad estructural suficiente para ser amplificado por PCR (Tengel *et al.*, 2001), siendo similares entre sí, lo cual le da el carácter de reproducibilidad al ensayo.

Thion *et al.* (2002) lograron detectar fácilmente los genes endógenos asociados con la lectina en harinas de soya muestreados en campos experimentales de dos grandes empresas comercializadoras de OVM en el mundo. Resultados similares fueron obtenidos por Quirasco *et al.* (2004) al evaluar tortillas mexicanas de maíz elaboradas de diferentes formas, en donde los mejores resultados de la evaluación del gen endógeno se obtuvieron en las tortillas preparadas con granos de maíz con poco procesamiento.

Aplicación de la estrategia de detección general primaria

Evaluación de la presencia del P35S

La estrategia empleada en esta investigación fue diseñada para reconocer de forma específica a la secuencia descrita en el GenBank con el número de accesión V00141. Los resultados de la Figura 3 indican que la muestra comercial 5 presentó la banda de 195 pb (carril 9), la cual está asociada con la existencia del P35S, el cual puede encontrarse inserto en el genoma de la planta de soya desde una copia, hasta un número variable de las mismas (Hemmer, 1997; Pietsch *et al.*, 1997).

En la actualidad la mayoría de los cultivos transgénicos comercializados contienen la secuencia de este promotor o un “enhancer” del mismo, dado que son secuencias casi universales de reconocimiento de la ARN polimerasa relacionados con la expresión de los transgenes, motivo por el cual es frecuentemente utilizado en ingeniería genética para lograr tal fin (Hemmer, 1997; Pietsch *et al.*, 1997). Es común encontrarse en los siguientes eventos de transformación: soya GTS 40-3-2, maíz Bt-176, Bt-11, MON810, MON809 y en tomates de larga duración y es detectable a límites de 0,1% m/m en granos de soya y maíz, empleando como materiales de referencia aquellos que han sido certificados por la Joint Research Center (ISO, 2006b).

En el caso de la soya, al hacer una revisión en varios portales especializados en detección de OVM, se pudo determinar que el evento de transformación GTS 40-3-2 posee un inserto simple que contiene un “enhancer” del P35S asociado con un péptido de tránsito unido al cloroplasto de *Petunia hybrida*, lo cual se corresponde con los resultados antes indicados. También

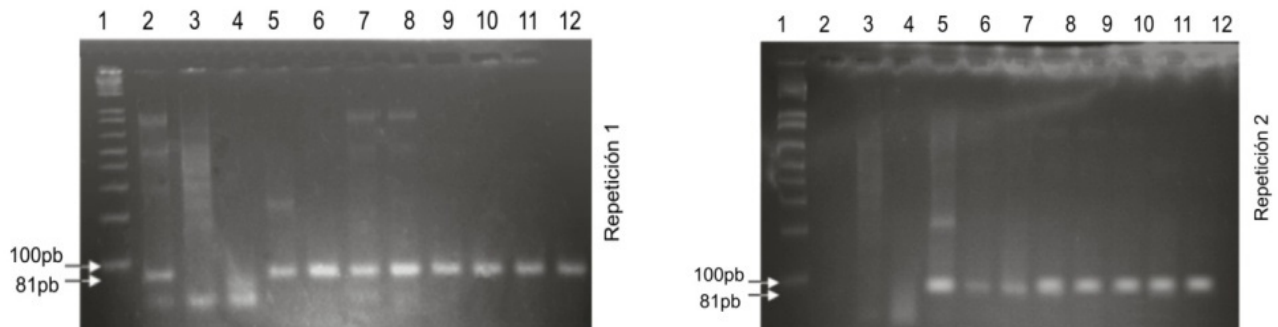


Figura 2. Amplificación del gen de la lectina en muestras comerciales de semillas de soya. Carril 1: Marcador de ADN 1 kb plus (Invitrogen), carril 2: Control negativo de transgénico, carril 3: Control negativo de reacción, carril 4: Control negativo de endógeno, carril 5: Control detectable de transgénico, carriles 6 a 10: Muestras comerciales 1 a 5, carriles 11 y 12: Muestras común 1 y 2.

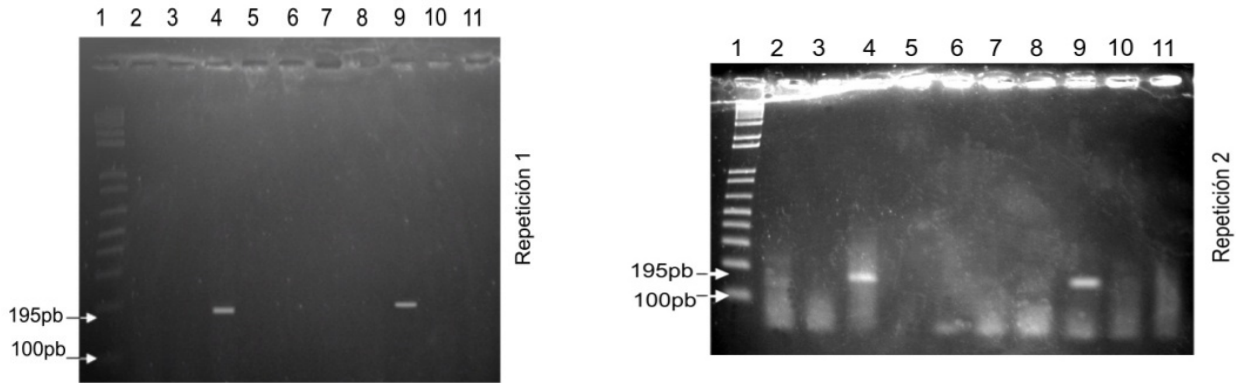


Figura 3. Productos de amplificación del P35S en muestras comerciales de semillas de soya. Carril 1: Marcador de ADN 1 kb plus (Invitrogen), carril 2: Control negativo de transgénico, carril 3: Control negativo de reacción, carril 4: Control detectable de transgénico, carriles 5 al 9: Muestras comerciales 1 al 5, carriles 10 y 11: Muestras común 1 y 2.

resulta interesante indicar que no se han observado amplificaciones con ADN de plantas cultivadas no modificadas genéticamente, en ausencia del material genético del virus, exceptuándose de esta regla a las especies de la familia *Brassicaceae*, *Resedaceae* o *Solanaceae* (Brunt *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1997), en donde pueden ocurrir infecciones naturales del virus del mosaico de la coliflor y por tanto, arrojar resultados falsos positivos, motivo por el cual deben realizarse en esos casos pruebas adicionales para confirmar la existencia del P35S.

Evaluación de la presencia del TNOS

La estrategia de detección empleada se diseñó para reconocer la secuencia diana asociada con el TNOS, la cual se encuentra registrada en el GenBank con el número V00087. Los resultados indican que la muestra comercial 5 presentó una banda de 127 pb (carril 9, Figura 4), similar al producto del control verdadero de detección (carril 4, Figura 4). La presencia de ese fragmento indica que la muestra comercial 5 contenía ADN amplificable de una fuente similar o igual al TNOS.

Por otra parte, dado que la mayoría de los OVM considerados de primera generación poseen esta secuencia terminadora en la construcción transgénica (Pietsch *et al.*, 1997), diversas instituciones europeas recomiendan su amplificación en ensayos de laboratorio para reconocer de forma general si se está o no en presencia de un OVM, teniendo la debida cautela de que no hayan ocurrido infecciones involuntarias por *A. tumefaciens*, dado que esta bacteria, así como parientes cercanas a ella, se encuentran de forma natural en el suelo (Würz y Willmund, 1997). También se resalta el hecho de que el límite de detección es mucho menor para esta estrategia (2%), comparada con la del P35S (ISO, 2006b).

En el entendido de que ambas pruebas de detección general no son concluyentes para señalar a una muestra como “detectada OVM”, se procedió a evaluar con mayor detalle el ADN que contenían la secuencia diana de interés, que en este caso se corresponde con la muestra comercial 5. Se aplicó entonces una prueba adicional con el fin de confirmar el origen transgénico de la muestra y la identificación del evento específico

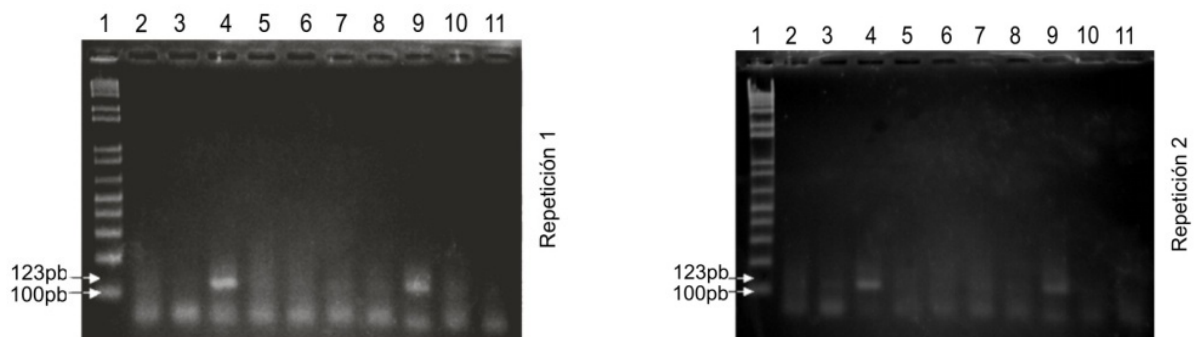


Figura 4. Productos de amplificación del TNOS en muestras comerciales de semillas de soya. Carril 1: Marcador de ADN 1 kb plus (Invitrogen), carril 2: Control negativo de transgénico, carril 3: Control negativo de reacción, carril 4: Control detectable de transgénico, carriles del 5 al 9: Muestras comerciales 1 al 5, carriles 10 y 11: Muestras común 1 y 2.

de la secuencia modificada genéticamente. Para ello, se inició una búsqueda *in silico* en sitios web especializados, tomando como criterios que la muestra comercial 5 fue detectada para P35S y TNOS. De tal búsqueda se desprende que el evento GTS 40-3-2 cumplía con los criterios antes indicados, por lo que se procedió a confirmar este evento de transformación, mediante la aplicación de la estrategia evento específico.

Identificación del evento específico GTS 40-3-2

Se pudo confirmar tanto por PCR convencional, así como por PCR en tiempo real, que la muestra comercial 5 contiene el evento de transformación asociado con la tolerancia al herbicida glifosato, comercializado en el ámbito agrícola como soya "Round up Ready®" (soya RR®). También, se sabe que esta construcción ha sido utilizada en otros OVM, y en otros cultivos, con los mismos resultados en cuanto a características agronómicas (Ferreira *et al.*, 2012).

Esta soya se liberó y adoptó en Argentina en 1996 y es considerado el producto biotecnológico que modificó el mercado de la producción de OVM en el mundo (James, 2014). Este evento fue desarrollado por una reconocida empresa transnacional, con el fin de inhibir en la planta de soya la producción de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), y por tanto conferirle resistencia al herbicida glifosato (Harrigan *et al.*, 2007). La EPSPS participa en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano. El glifosato se une e inactiva de forma específica a la EPSPS, por lo que no ocurre el crecimiento de los organismos a los cuales no se les ha realizado dicha modificación genética (Torres *et al.*, 2003). Cabe resaltar que la EPSPS está presente en todas las plantas, las bacterias, los hongos, pero no en los animales, razón por la cual puede considerarse selectivo a este grupo de organismos, y por tanto muy poco tóxico para los mamíferos (Padgete *et al.*, 1995).

Los cultivares de soya RR® normalmente son empleados donde quiera que esté la semilla disponible y los agricultores consideran que les ofrece las ventajas apropiadas para el control de malezas (Padgete *et al.*, 1995). De allí se deriva su tan ampliado uso en países, como Argentina, China, EEUU y Brasil, donde se evita la expansión de la frontera agrícola a cuenta de emplear suelos muy degradados por erosión y compactación (James, 2014).

Según los resultados derivados en esta investigación, de siete materiales comerciales de soya evaluados, se detectó uno para el evento de transformación GTS 40-3-2, mientras que los pequeños agricultores aparentemente no han tenido acceso a las nuevas tecnologías.

Sin embargo, es importante indicar que el hecho de detectar un material como OVM no significa que el cultivar lo sea, pues fortuitamente pudo haber ocurrido contaminación por cruces naturales involuntarios, mezclas de semillas, o incluso una incongruencia entre la semilla muestreada y el cultivar registrado en el Senasem.

CONCLUSIONES

Las tiras de flujo lateral no son un procedimiento de detección recomendable de aplicar a las semillas, pues el procesamiento térmico compromete la estructura de la proteína transgénica, y por tanto su reconocimiento el área de la banda que reconoce dicha proteína.

En cuanto a la detección de las secuencias asociadas con el P35S y TNOS, se detectó una muestra, de siete evaluadas, que contaba con ambos blancos de detección, lo cual arrojó los primeros indicios sobre el posible evento de modificación genética a detectar en la siguiente fase.

Se logró la detección e identificación del evento de transformación GTS 40-3-2, cuyo identificador único es "MON-Ø4Ø32-6 Round up Ready soybean®", el cual es un material modificado genéticamente desarrollado por una gran empresa biotecnológica transnacional, que le confiere al cultivo de soya resistencia al herbicida glifosato.

De esta forma se tiene el primer registro formal del uso de semillas comerciales OVM de soya en Venezuela. Por tanto lo más sensato de parte de las autoridades nacionales sería esclarecer dicha situación, establecer para el país una nueva posición nacional en cuanto al uso de OVM o aplicar de manera efectiva y oportuna los instrumentos legales que rigen la materia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuerdo con Motivo del Día Internacional de la Diversidad Biológica. 2008. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. N° 38.942. 30 mayo 2008. Caracas, Venezuela.
- AOSA. Association of Official Seed Analysis. 1985. Rules for testing seeds. *J. Seed Technol.* 6: 111-114.
- Briceño, E.; E. de Suarez; C. Michelangeli; D. Feliciangeli; E. Otaiza; J. Mendible; M. Villalon; M. Aguilera; H. Ceballos; J. Godoy; C. Camilloni. 2003. Código de Bioética y Bioseguridad. 2^{da} ed. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Caracas, Venezuela. 134 p.

- Brugés, M. 2005. Bio-guía para periodistas: Biotecnología Agrícola. Publicaciones de Agrobio. Bogotá, Colombia. 74 p.
- Brunt, A.; K. Crabtree; M. Dallwitt; A. Gibbs; L. Watson. 1996. Viruses of plant: description and list from the VIDE database. CABI. Londres, Inglaterra. 1484 p.
- Cazzola, M.; S. Petruccelli. 2006. Semiquantitative analysis of genetically modified maize and soybean in food. *Elec. J. Biotech.* 9: 320 – 325.
- Corbisier, P.; S. Trapmann; D. Gancberg; L. Hannes; P. Iwaarden; G. Berben; H. Schimmel; H. Emons. 2005. Quantitative determination of Roundup Ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. *Anal. Bioanal. Chem.* 383: 282–290.
- Di Bernardo, G.; S. Del Gaudio; U. Galderisi; A. Cascino; M. Cipollaro. 2007. Evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biotech. Pro.* 23: 297-301.
- Ferreira, J.; G. Almeida; A. Borém; W. Silva; T. Alemu. 2012. Biosafety and Detection of Genetically Modified Organisms. In: Ozden, Y. (Ed.) Transgenic plants. Advances and Limitations. In *Tech.* pp 427-448. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/30887.pdf>. [Consultado: 15/01/2014]
- Gepts, P. 2002. A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering. *Crop Sci.* 42: 1780–1790.
- Harrigan, G.; W. Ridley; S. Riordan; M. Nemeth; R. Sorbet; W. Trujillo; M. Breeze; R. Schneider. 2007. Chemical composition of glyphosate-tolerant 40-3-2 grown in Europe remains equivalent with that of conventional soybean (*G. max*). *J. Agric. Food Chem.* 55: 6160-6168.
- Hemmer, W. 1997. Foods derived from genetically modified and detection methods. BATS report. Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Suiza. 2/97. pp. 40-44.
- ISO. International Standardization Organization. 2005. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos. Norma 21570. Génova, Suiza. 23 p.
- ISO. International Standardization Organization. 2006a. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Toma de muestra. Norma 21568. Génova. Suiza. 21 p.
- ISO. International Standardization Organization. 2006b. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos. Norma 21569. Génova. Suiza. 19 p.
- ISTA. International Seed Testing Analysis. 2003. Proceeding 16th annual symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty. Supplement to volume 1. San Francisco, EUA. 95 p.
- James, C. 2014. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief No. 49. ISAAA. Ithaca, EUA. 17 p.
- Lipp, M.; E. Anklam; J. Stave. 2000. Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean ind food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 83: 919-927.
- Lipp, M.; P. Brodman; K. Pietsch; J. Pauwel; E. Anklam. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybean and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* 82: 923-928.
- Miranda, F. 2005. Evaluación del sistema de flujo nacional e importado de granos, semillas u otros materiales de reproducción existente en la República Bolivariana de Venezuela. Consultoría realizada para el proyecto Marco Nacional de Seguridad de la Biotecnología de la República Bolivariana de Venezuela. Oficina Nacional de Diversidad Biológica. Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. Caracas, Venezuela. 62 p.
- Nikolic, Z.; M. Milosevic; M. Vujakovic; D. Marinkovic; A. Jevtic; S. Balesevic-Tubic. 2008. Qualitative triplex PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Biotech. Biotechnol. Equip.* 22: 801-803.
- Padgete, S.; K. Kolac; X. Delany; D. Re; B. La Velle; C. Tinius; C. Rhodes; Y. Otero; G. Bary; D. Eichholtz; V. Peschke; D. Nida; N. Taylor; G. Nishore. 1995. Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. *Crop. Sci.* 35: 1451-1461.

- Pietsch, K.; H. Waiblinger; P. Broddman; A. Wurz. 1997. Screening method for the detection of genetically modified plants. *Dtsch. Lebens. Rundsch.* 93: 35-38.
- Qiu, S.; W. Wintermantel; Y. Sha; J. Shoelz. 1997. Light-dependent systemic infection of solanaceous species by cauliflower mosaic virus can be conditioned by viral gene encoding and aphid transmission factor. *Virology* 227: 180-188.
- Quirasco, C.; B. Schoel; J. Plasencia; J. Fagan; A. Galvez. 2004. Suitability of real time quantitative PCR and enzyme linked immunosorbent assay for cry9C detection in mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *J. AOAC Int.* 87: 639-646.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2000. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Montreal, Canada.
- Stave, J. 2002. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. *J. AOAC Int.* 85: 780-786.
- Tengel, C.; P. Schubler; E. Setze; J. Balles; M. Sprenger. 2001. PCR- Based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Biotechniques* 31: 426 – 429.
- Thion L.; C. Vossen; B. Couderc; M. Erard; B. Clemenson. 2002. Detection of genetically modified organisms in food by DNA extraction and PCR amplification. *J. Biochem. Mol. Biol. Edu.* 30: 51-55.
- Torres, A.; W. Nascimento; S. Vasconcelos; F. Souza. 2003. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. *J. Pesq. Agropec. Bras.* 38: 1053-1057.
- Van Duijn G.; R. van Biert; H. Bleeker-Marcelis; I. Van Boeijen; A. Jama; S. Jhakrie; M. Helsing. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: Bridging the methods. *J. AOAC Int.* 85: 787-791.
- Wurz, A.; R. Willmund. 1997. Identification of transgenic glyphosate-resistant soybean. *In: Schreiber, G.A.; K. Bogl (Eds.). Food produced by means of genetic engineering. Status report. BgVV-heft 1/1997. Berlín, Alemania. pp. 115-117.*