

Universidad Central de Venezuela
Facultad de Agronomía
Comisión de Estudios de Postgrado
Postgrado en Agronomía

Trabajo de Grado de Maestría

**Detección de secuencias asociadas a Organismos Vivos Modificados
en semillas de maíz (*Zea mays* L.) y soya (*Glycine max* L. Merrill)**

Ing. Agr. Luis Alexander Díaz M.

Tutor:

Dr. Iván Galindo Castro

Comité Consejero:

Dra. Catalina Ramis

Maracay, julio de 2013

ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAR	Fosfinotricina Acetiltransferasa aislados de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
BCH	Biosafety Clearing House
BM	Biotecnología Moderna
CaMV	Virus del Mosaico de la Coliflor
CDB	Convenio de Diversidad Biológica
CNB	Comisión Nacional de Bioseguridad
CIISB	Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología
CRL	Community Reference Laboratory for GM Food and Feed. European Commission.
DMSO	Dimetil sulfato
dNTP	Di-nucleótidos
EEUU	Estados Unidos de Norteamérica
ELISA	Técnica inmuno absorbente ligada a una enzima
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria
EPSPS	enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GMDD	GMO Detection Method Database
GORBV	Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela
IDEA	Instituto de Estudios Avanzados
IdU	Identificadores únicos
IG	Ingeniería genética
ILSI	International Life Science Institute
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
INSAI	Instituto Nacional de Sanidad Agrícola Integral
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISO	International Organization for Standardization
ISTA	Asociación Internacional de Pruebas en Semillas
MG	Modificado Genéticamente
MgCl	Cloruro de magnesio
OECD	Organization for Economic Cooperation Development
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
OMG	Organismo Modificado Genéticamente
OVM	Organismos Vivos Modificados
PAT	Fosfinotricina Acetiltransferasa aislados de <i>S. viridochromogenes</i>
PCB	Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RR	Round up Ready
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real para cuantificación
SENASA	Servicio Nacional de Semillas
TNOS	Nopaline Synthase Terminator
UE	Unión Europea

Resumen

La Biotecnología Moderna, es en la actualidad uno de los sectores científicos y económicos más estables a nivel mundial. Mediante su aplicación es posible la obtención de los Organismos Vivos Modificados (OVM), los cuales son usados en áreas diversas. A pesar de ello, muchos consideran que su utilización debe estar constantemente sometida a continuos procesos de evaluación. Históricamente, Venezuela ha sido un país importador de productos agrícolas, en donde recientemente la misma pasó a ser miembro pleno de un importante acuerdo internacional en materia de intercambio de productos de diversa índole, en la región. También se sabe que en la actualidad, reina una moratoria relacionada con el uso de OVM, la cual se ha intensificado en las principales ciudades del país, materializándose en la ejecución de foros, charlas, talleres y grafitis, en contra de los OVM. Dado este escenario de marcada polarización, se plantea por primera vez en el país la necesidad de detectar secuencias asociadas a OVM en semillas de maíz y soya, debido a la susceptibilidad que tienen estas estructuras de introducirse al ambiente, como parte inicial de cualquier sistema de producción agrícola. Para ello, se procedió a realizar un muestreo de las principales semillas de maíz y soya registradas como cultivares elegibles en el Servicio Nacional de Semillas. Se inició las actividades de detección con un ensayo sencillo, mediante el cual se evaluaron las proteínas CP4 EPSPS, Cry 1Ab y Cry3Bb, empleando las tiras de flujo lateral diseñadas por "Strategic Diagnostic Inc". Posteriormente se aplicó las estrategias de "screening" general primario y evento específico, por PCR en tiempo final y real. En el primer caso fueron evaluados, para ambos cultivos, las secuencias asociadas al promotor 35S y terminador NOS, adicionando las secuencias de PAT y BAR para maíz. Posteriormente, solo a las muestras que se detectaron para alguna de las secuencias antes mencionadas, se aplicó la estrategia para la detección de los eventos T25, Bt-11 y TC1507 para maíz y del evento GTS-40-3-2 para soya. Mediante la aplicación de las tiras de flujo lateral no se detectó ninguna de las proteínas que evalúa la prueba. En cuanto a las pruebas basadas en ADN para maíz, se detectó las secuencias del promotor 35S, terminador NOS y PAT, con estos resultado se procedió a identificar q el maíz proviene de un evento apilado, que le confiere al cultivo tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y resistencia a insectos lepidópteros, evento DAS-Ø15Ø7-1 de Pionner. En el caso de soya se logró detectar un cultivar para promotor 35S y terminador NOS, lo cual dio pie a la identificación del evento GTS-40-3-2, que le confiere al cultivo tolerancia al herbicida glifosato. Según estos resultados, se sientan las bases del uso de OVM en los sistemas de producción agrícolas venezolanos, que evidentemente ingresaron al país de forma ilegal, y fueron liberados de forma impropcedente en el ambiente, constituyéndose este en un ejemplo de movimiento transfronterizo ilícito, dado que el mismo se realizó en contravención de las medidas nacionales que rigen la aplicación del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. Estos resultados ponen de manifiesto el hecho innegable de que en la práctica el país no realiza ningún tipo de pruebas para conocer el estatus de modificación genética del material sujeto de introducción al país, siendo de particular importancia para el Estado la ejecución de esta labor debido a la política nacional de negar el uso de OVM. Por ello, se sugiere a las autoridades respectivas sincerar la situación nacional, mediante la aplicación de las leyes en la materia o actualizar la posición nacional en cuanto al uso de las nuevas tecnología en la agricultura.

Palabras claves: organismos vivos modificados, semillas, maíz, soya.

Introducción General

Los humanos han manipulado, y manipulan, 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). Una de las áreas en las cuales la modificación genética ha tenido mayor perfil público y donde se han debatido desde sus máximos beneficios, hasta sus grandes limitaciones es la Ingeniería Genética (IG) (Díaz, 2004). A partir de la IG, es posible el desarrollo de los Organismos Vivos Modificados (OVM), Organismos Modificados Genéticamente (OMG) o transgénicos, los cuales son definidos por el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (PCB) (2000), como cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético obtenido mediante la aplicación de la Biotecnología Moderna (BM).

Diversas especies, desde bacterias, hasta planta y animales han sido modificados genéticamente (MG), en algunos casos suprimiendo genes, en otros introduciendo genes de especies biológicamente distantes, otros mediante el silenciamiento de sus genes a partir de su mismo acervo genético o mediante la sobreexpresión de un gen que posea de forma natural la especie. Los OVM mayormente empleados son aquellos en los cuales se le han introducido genes de especies taxonómicamente lejanas para generar bienes y servicios directos para el ser humano. El primer transgénico fue presentado al mundo en 1972 como un ensayo meramente científico, por Jackson, Symmons y Berg, en el cual se insertaron genes de un virus de simio en fagos de bacterias de *Escherichia coli* (Jackson, Symmons y Berg, 1972). Posteriormente en la misma bacteria se introdujo un gen humano para producir insulina recombinante y desde 1982, la industria farmacéutica optó por fabricar la insulina humana mediante IG. Las técnicas de IG aplicadas al área agrícola tardaron un poco más en dar sus frutos, fue en 1994, cuando en USA se comercializa el primer cultivo MG, el tomate "Flavr Savr" o de larga duración, en el cual se suprimió la síntesis de una enzima (poligalacturonasa) que interviene en la degradación de la peptina de la pared celular del fruto para darle mayor duración en el anaquel (Nap et. al., 2003). Nace de esta manera una verdadera revolución tecnológica y científica para la producción de alimentos, denominada "la nueva revolución verde", basada en la producción a partir de organismos resultantes de la BM.

Si bien es cierto que en la actualidad los bienes y servicios ofertados a partir del desarrollo de la BM y la IG son comunes de conseguir e incluso más económicos que los productos desarrollados por la vía convencional, existe también otra realidad, la cual está relacionada con las preocupaciones genuinas de la sociedad ante lo desconocido. Es así como desde 1974, en California, EEUU, se propone una moratoria al uso de los organismos resultantes de la aplicación de la IG, hasta tanto no se tuviese mejor conocimiento sobre cuáles serían los impactos de los mismos, sobre la salud humana y el ambiente, entre otras (Nap et. al., 2003).

Posteriormente, en 1992, en la Cumbre de la Tierra se da a conocer el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) y con él se sientan oficialmente las bases para desarrollar un documento legal en el cual se dejaran claras las reglas en cuanto a los usos, manejos, transferencia y utilización segura de los OVM. El CDB contiene tres disposiciones directamente relacionadas con los OVM. Una de ellas es el artículo 19.3, el cual generó las negociaciones para el desarrollo del PBC. Otros dos artículos contienen obligaciones aplicables a todas las Partes en el CDB, independientemente de que se conviertan o no en Partes en el Protocolo. Por una parte el artículo 8g trata sobre medidas nacionales en

general, siendo el espíritu de esto el exhortar a las Partes a que regulen, administren o controlen los riesgos asociados a los OVM que pudieran tener efectos adversos sobre la conservación y el uso sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana. Por otra parte, el artículo 19.4 toma en consideración la transferencia de OVM entre Partes. Requiere que cada Parte proporcione información sobre sus regulaciones nacionales en materia de uso y seguridad a la Parte a la que el OVM pretende enviarse, así como cualquier información disponible sobre los efectos adversos que la introducción podría tener.

En 2000, es presentado en Montreal-Canadá, el PCB, cuyo objetivo principal es “contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los OVM resultantes de la BM que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos”. Como se entiende, el PCB básicamente regula lo concierne a movimientos transfronterizos de OVM, materia estrechamente ligada a las relaciones comerciales que se establecen entre países productores y demandantes de alimentos. Sin embargo, en su artículo 4, queda expresa la tarea de regular otros ámbitos tales como “el tránsito, la manipulación y la utilización de todos los OVM”, haciendo especial referencia en “los posibles efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana”.

El artículo 18 del PCB, indica que los OVM objeto de movimientos transfronterizos intencionales sean manipulados, envasados y transportados en condiciones de seguridad, teniendo en cuenta las normas y los estándares internacionales pertinentes, además de catalogar la documentación que debe acompañar a un OVM según sus usos en: 1) OVM destinados a uso directo como alimento humano o animal, o para procesamiento, el cual deberá estar acompañado de una especie de acta donde se asienta la polémica frase “pueden llegar a contener OVM (“main contain”)” y que no están destinados para su introducción intencional en el medio, así como un punto de contacto para solicitar información adicional; 2) OVM destinados para uso confinado; el cual debe sustentarse en los requisitos para su manipulación; el punto de contacto para obtener información adicional, incluido el nombre y las señas de la persona y la institución a que se envían los OVM; y 3) OVM destinados a su introducción intencional en el ambiente, en el cual se deben especificar la identidad y los rasgos/características pertinentes, los requisitos para su manipulación, almacenamiento, transporte y uso seguros, el punto de contacto para obtener información adicional y, según proceda, el nombre y la dirección del importador y el exportador; este último además contiene una declaración de que el movimiento se efectúa de conformidad con las disposiciones del PCB las cuales son aplicables al exportador. En este sentido la evaluación de las semillas se conforman como una estructura vegetal altamente susceptible de evaluar desde el punto de vista biotecnológico dado que las mismas serán introducidas al ambiente, ya sea de manera deliberada, accidental o de forma ilícita, con el fin de iniciar la operatividad de cualquier sistema de producción agrícola.

Por otra parte, se destaca la posición de Venezuela ante el tema, pues en diversas oportunidades y varios escenarios, políticamente se ha rechazado de forma activa el uso, manejo, transferencia y utilización de OVM desarrollados por empresas transnacionales sin conocer sus efectos sobre el ambiente, la salud y la agricultura de la nación, posición que se adecua a lo señalado en el Principio 15 de la Declaración de Río en donde se

señala la obligatoriedad del Estado de aplicar las medidas de precaución cuando se supone exista peligro de daño claro o irreversible.

En contraste con lo anterior, el país ha suscrito diversos tratados de cooperación e intercambio agrícolas con países de la región, tales como Argentina, Brasil y Uruguay, entre otros, en donde la utilización y producción de OVM es una práctica común. En consecuencia, es altamente probable que los OVM se encuentren en las mercaderías que estos países están expidiendo a Venezuela, pues la segregación entre productos OVM y no OVM no es una tarea común, aparte de que la misma acarrea elevados costos para los países compradores. En los puntos aduanales el Instituto Nacional de Sanidad Agrícola Integral (INSAI) es la institución legisladora en materia de entrada de semillas al país y de la aplicación de las medidas de bioseguridad relacionadas con ellas. A los fines, el INSAI solicita entre otros requisitos los datos del exportador del producto y su representante, la firma autorizada del importador solicitante, las características del producto a importar, el medio de transporte a utilizar y el certificado de que el material objeto de la introducción es “no transgénico”. Es de hacer notar, que el INSAI no posee la capacidad técnica e institucional para realizar las pruebas de detección de OVM, por lo que solo confía en la buena voluntad del importador para permitir la entrada de semillas, y otros insumos de este tipo, al país.

De allí nace la necesidad de realizar la detección de OVM susceptible de introducirse al ambiente, para de esa manera aportar un grano de arena en el cumplimiento de las leyes nacionales relacionadas con la materia, particularmente a lo establecido en el PCB. Se aclara también que se hizo la evaluación en semillas comerciales dado que de esta manera se esclareció que ya en nuestro país debe hacerse una actualización urgente de nuestro marco jurídico y de la posición nacional pues se pudo conocer que ya se están empleando OVM de forma deliberada en el ambiente. Por ello, la ruta a seguir sería la redacción del Reglamento Parcial a la Ley de Gestión de la Diversidad Biológica, con el fin, no de castigar a quienes ya estén empleando la tecnología, sino de esclarecer las reglas de juego para evitar daños irreversibles a los sistemas de producción agrícola, a la diversidad biológica, la economía del país o la salud de los consumidores.

La presente investigación está dividida en cinco capítulos a saber: Capítulo I: Situación mundial del uso y la producción de OVM; Capítulo II: aspectos políticos y legales de la seguridad de la BM en Venezuela, Capítulo III: Métodos para la detección e identificación de un OVM, Capítulo IV: Detección e identificación de secuencias asociadas a OVM en semillas de maíz (*Zea mays* L.) empleando los métodos de inmunoensayos y análisis por PCR en tiempo final y real y Capítulo V: Detección e identificación de eventos asociados a OVM en semillas de soya (*Glycine max* L. Merrill) empleando los métodos de inmunoensayos y análisis por PCR en tiempo final y real.

Objetivos

1. Realizar una revisión general sobre la situación mundial del uso y la producción de OVM.
2. Desarrollar los aspectos relacionados con los elementos políticos y legales de la Seguridad de la BM en la República Bolivariana de Venezuela.
3. Indicar detalladamente los métodos para la detección, identificación y cuantificación de OVM.
4. Estudiar la presencia y las características de secuencias de ADN asociadas a modificaciones genéticas comerciales en semillas de maíz y soya en la cadena agroalimentaria del país:
 - 4.1. Detectar e identificar secuencias asociadas a OVM en semillas de maíz (*Zea mays* L.) empleando los métodos de inmunoensayos y análisis por PCR en tiempo final y real.
 - 4.1.1. Aplicar las tiras de flujo lateral para la evaluación de los eventos de transformación transgénica de maíz relacionados con tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos lepidópteros.
 - 4.1.2. Evaluar la presencia del Promotor 35S, terminador NOS, Pat y Bar, asociados con la estrategia de detección de OVM general o “screening” primario en semillas de maíz.
 - 4.1.3. Detectar el evento de transformación de maíz TC1507, por medio de la aplicación de la PCR en tiempo real.
 - 4.2. Detectar e identificar eventos asociados a OVM en semillas de soya (*Glycine max* L. Merrill) empleando los métodos de inmunoensayos y análisis por PCR en tiempo final y real.
 - 4.2.1. Aplicar las tiras de flujo lateral para la evaluación del evento de transformación transgénica de soya GTS40-3-2.
 - 4.2.2. Evaluar la presencia del Promotor 35S y el terminador NOS, asociados con la estrategia de detección de OVM general o “screening” primario en semillas de soya.
 - 4.2.3. Detectar el evento de transformación de soya GTS40-3-2, por medio de la aplicación de la PCR en tiempo final y real.

Capítulo I

Situación mundial del uso y la producción de OVM

Introducción

La producción y comercialización de OVM se inició en 1992 con la autorización otorgada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU), al producto tomate “Flavr Savr” (Redenbaugh *et. al.*, 1993; Zhang y Guo, 2011). Posteriormente en 1996, se extiende aún más la producción de OVM a nivel internacional, adhiriéndose a EEUU otros cinco países: Canadá, Argentina, China, Sur África y Australia, quienes asumieron el reto de plantar OVM, ya sea para la alimentación humana, animal o para liberación al ambiente. En 2012, fueron sembradas 170 millones de hectáreas con OVM en 28 países, 20 de los cuales son países con economías emergentes y 8 industrializados, y fueron aprobados en total cerca de 200 eventos de transformación transgénicos, todos ellos asociados con caracteres agronómicos (Zhang y Guo, 2011). En el presente capítulo se hace una revisión general relacionada con los usos y producción de OVM en el mundo.

Generaciones de OVM

Como se indicó anteriormente, el primer cultivo OVM comercializado fue el tomate de larga duración, característica que beneficiaba directamente al comprador del producto. A pesar de ello, el mismo no tuvo la acogida apropiada por parte de los consumidores y sale rápidamente de los anaqueles. En años posteriores, los protagonistas de las nuevas tecnologías agrícolas pasan a ser el maíz y la soya, acompañados también del algodón, y un poco después por la canola, quienes siguen siendo los cultivos por excelencia para la producción y comercialización de OVM a nivel internacional. Esta vez, las características modificadas estaban más relacionadas con los rasgos agronómicos que el productor había demandado para mejorar la eficiencia de sus sistemas de producción.

Es así como nacen los OVM considerados de primera generación, siendo estos los relacionados con la tolerancia al herbicida “Round up Ready” o la resistencia a insectos taladradores, ambas características por separado, y en menor grado la resistencia a enfermedades fúngicas o virales. En una segunda generación, se inició la producción y comercialización de los cultivos con características apiladas, en los cuales se encontraba en el mismo cultivar las características de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos. Esto fue lo que catapultó al éxito en la adopción de cultivos OVM por parte de los agricultores a nivel mundial, ya que los mismos eran los principales favorecidos directos del desarrollo de dichas tecnologías.

Una tercera generación de OVM, incipientemente desarrollada, está relacionada con la producción de cultivos que le ofrecen al consumidor alimentos con características nutricionales mejoradas. A la fecha, se conoce el “golden rice”, un arroz desarrollado para suplir la deficiencia de vitamina A en poblaciones de escasos recursos del continente asiático (Ye *et. al.*, 2000; Zimmerman y Qaim, 2002; Potrykus, 2003). También se trabaja

en la obtención de aceite de soya y maíz cuyo contenido y composición nutricional complementa la dieta de quienes lo consumen, en cuanto al contenido de aminoácidos esenciales y mejores características de las grasas que los componen (James, 2013).

Los eventos apilados son una especialidad importante: en 2011, 12 países sembraron cultivos biotecnológicos con al menos dos eventos y 9 de ellos eran países en desarrollo. De los 170 millones de hectáreas agrobiotecnológicas cultivadas en todo el mundo, 42,2 millones (26 %) fueron de eventos apilados, frente a los 32,3 millones de 2010 (que eran el 22 % de 148 millones de hectáreas) (James, 2011; James, 2012 y James, 2013).

Para el 2013 se tiene previsto el lanzamiento comercial de un cultivar de maíz tolerante a la sequía, creándose de esta manera una cuarta generación de OVM (James, 2013); los mismos tienden al uso de cultivares que ayuden a aumentar la productividad de los cultivos en áreas en las que eventualmente no podrían cultivarse. Quizás ya en esta generación se apilen en un mismo cultivar las características agronómicas y nutricionales para la producción de OVM.

América: un continente marcadamente a favor de la producción de OVM

En 2012, la tasa de crecimiento de los cultivos transgénicos fue al menos tres veces más rápida y cinco veces mayor en los países en desarrollo, con 11% u 8,7 millones de hectáreas, versus 3% o 1,6 millones de hectáreas en países industrializados. Durante el período 1996 - 2011 los beneficios económicos acumulados fueron elevados en los países en desarrollo con US\$49.600 millones, comparados con US\$48.600 millones generados por los países industrializados. Sin embargo, en 2011 los beneficios económicos de los países en desarrollo fueron mayores con US\$10.100 millones, comparados con US\$9.600 millones de los países en desarrollo, con un total de US\$19.700 millones (James, 2013).

De las 170,3 millones de hectáreas que se sembraron y comercializaron de OVM a nivel internacional, en 2012, el 98% ($166,6 \times 10^6$ ha) se concentró en diez países, de los cuales cinco son países con economías emergentes (Brasil, Argentina, India, China y Sur África), y es donde se concentra aproximadamente el 40% de la población mundial. Otro dato interesante de resaltar, es que de estos 10 países, seis son americanos, quienes en su conjunto, sembraron el 86% ($146,4 \times 10^6$ ha) de la producción mundial de OVM (Cuadro 1). Por esta razón se señala que el continente americano ha jugado un rol importante desde la expansión de la producción mundial de OVM, y que además el mismo puede considerarse como una región marcadamente a favor de los transgénicos (James, 2013).

Para el 2012, EEUU sigue siendo el principal país productor de OVM en el mundo, quién plantó, 69,5 millones de hectáreas. Por su parte, Brasil ocupa el segundo lugar, sembrando 36,6 millones de hectáreas, emergiendo de esta forma como uno de los grandes gigantes en la producción de OVM, debido a que su sistema regulatorio le permite aprobar las nuevas solicitudes de forma fácil, fluida y cómoda y los agricultores están ganados a utilizar los nuevos eventos aprobados. Resulta interesante también mencionar que en Brasil una empresa gubernamental desarrolló completamente, un

nuevo OVM, con sus propios recursos, demostrando así su impresionante capacidad técnica para desarrollar, producir e implementar un nuevo cultivo biotecnológico de última generación (James, 2013).

Cuadro 1. Área sembrada (millones de hectáreas) y cultivos modificados genéticamente en los 10 principales países productores de OVM en el mundo.

País	Área (x10 ⁶ Ha)	Cultivo
<u>EEUU*</u>	69,5	Maíz, soya, algodón, remolacha azucarera, lechosa, calabacín.
<u>Brasil*</u>	36,6	Maíz, soya, algodón.
<u>Argentina*</u>	23,9	Maíz, soya, algodón.
<u>Canadá*</u>	11,6	Maíz, soya, algodón, remolacha azucarera.
India	10,8	Algodón.
China	4	Algodón, lechosa.
<u>Paraguay*</u>	3,4	Soya, maíz y algodón.
Sur África	2,9	Soya, maíz y algodón.
Pakistán	2,8	Algodón.
<u>Uruguay*</u>	1,4	Soya y maíz.
Total general →		170,3 (100%)
Total 10 países →		166,9 (98%)
*Total países americanos →		146,4 (86%)
Total otros países →		20,5 (12%)

Fuente: James, 2013.

Argentina y Canadá conservaron la tercera y cuarta posición de la clasificación mundial y registraron cifras récord de superficie con cultivos de OVM de 23,7 y 10,4 millones de hectáreas respectivamente, para 2011. Las cifras más notables fueron el incremento de 900.000 hectáreas de maíz biotecnológico en Argentina (2011) y el de 8,4 millones de hectáreas de canola tolerante a herbicidas en Canadá (2012), lo cual se traduce en una tasa de adopción del 97,5%.

Durante 2012, 28 países plantaron cultivos biotecnológicos para comercialización, otros 31 países, han concedido 1996 regulaciones que aprueban cultivos biotecnológicos para importación, uso en alimentación y forraje y para liberar al ambiente. Un total de 2497 autorizaciones que incluyen 25 cultivos GM y 319 eventos GM han sido emitidas por las autoridades competentes en 59 países, de las cuales 1129 son para uso alimentario (uso directo o para procesamiento), 813 son para uso como forraje (uso directo o para procesamiento) y 555 son para siembra o liberación al medio ambiente (James, 2012; James, 2013).

De los 59 países con autorizaciones, EEUU tiene la mayor cantidad de eventos aprobados (196), seguido por Japón (182), Canadá (131), México (122), Australia (92), Corea del Sur (86), Nueva Zelanda (81), Unión Europea (67, incluyendo autorizaciones que han expirado o que se encuentran en proceso de renovación), Filipinas (64), Taiwán (52) y Sudáfrica (49). El maíz tiene la mayor cantidad de eventos aprobados (121 eventos

en 23 países), seguido por el algodón (48 eventos en 19 países), papa (31 eventos en 10 países), canola (30 eventos en 12 países) y soja (22 eventos en 24 países). El evento que ha recibido la mayor cantidad de autorizaciones es el maíz tolerante a herbicida, evento NK603 (50 autorizaciones en 22 países + 27 de la UE), seguido por la soja tolerante a herbicida, evento GTS-40-3-2 (48 autorizaciones en 24 países + 27 de la UE), el maíz resistente a insectos, evento MON810 (47 autorizaciones en 22 países + 27 de la UE), el maíz resistente a insectos, evento Bt11 (43 autorizaciones en 20 países + 27 de la UE), algodón resistente a insectos, evento MON531 (36 autorizaciones en 17 países + 27 de la UE) y algodón resistente a insectos, evento MON1445 (31 autorizaciones en 14 países + 27 de la UE) (Nap *et. al.*, 2003; James, 2013).

Bibliografía consultada

1. **James, C.** 2008. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2007. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
2. **James, C.** 2009. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2008. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
3. **James, C.** 2010. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2009. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
4. **James, C.** 2011. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2010. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
5. **James, C.** 2012. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2011. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
6. **James, C.** 2013. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2012. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
7. **Marshall, A.** 2009. 13.3 million Farmers cultivate GM crops. Nature biotechnology. 27 (3): 221.
8. **Nap, J.; P. Metz, M. Escaler y A. Conner.** 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Plant Journal. 33: 1 – 18.
9. **Potrykus, I.** 2003. *From “golden” to “nutritionally optimized” rice – and from a scientific concept to the farmer.* Ponencia presentada en la conferencia “In the Wake of the Double Helix: from the Green Revolution to the Gene Revolution”, Bolonia, Italia, 27-31 de mayo de 2003.
10. **Redenbaugh, K., T. Berner, D. Emlay, B. Frankos, W. Hiatt, C. Houck, M. Kramer, L. Malyj, B. Martineau, N. Rachman, L. Rudenko, R. Sanders, R. Sheehy y R. Wixtrom.** 1993. Regulatory issues for commercialization of tomatoes with an antisense polygalacturonase gene. J. In Vitro Cell. Dev. Biol. pp 17-26.
11. **Ye, X., S. Al-Babili, A. Kloti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, y I. Potrykus.** 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science. 287(5451): 303-305.
12. **Zhang D. y J. Guo.** 2011. The development and standardization of testing method for genetically modified organisms and their derived product. Journal of Integrative Plant Biology. 53 (7): pp. 539-551.
13. **Zimmerman, R. y M. Qaim.** 2002. Projecting the benefits of golden rice in the Philippines. Discussion Paper on Development Policy No. 51. Bonn, Alemania, Centre for Development Research (ZEF).

Capítulo II

Aspectos políticos y legales de la Seguridad de la Biotecnología Moderna en Venezuela

Introducción

En los años 50, del siglo pasado, el mundo abre paso al controversial y tan esperado conocimiento de la *genética*¹ moderna. James Watson, Francis Crick y Rosalind Franklin, entre otros, son los responsables del descubrimiento de la estructura de la molécula de la vida: el *ácido desoxirribonucleico (ADN)*² (Franklin y Gosling, 1953; Watson y Crick, 1953), la cual es una de las estructuras biológicas más conocida en la actualidad, *por estar presente en casi todos los organismos vivos*³ y poseer información codificante para la estructura, organización y funcionamiento celular (Streips y Yasbin, 2002; Lewis, 2003). Evidentemente, estos nuevos conocimientos adquiridos abrieron la posibilidad de modificar casi que cualquier característica genética de un organismo vivo (Bourlag, 2001; Conroy, 2002; Streips y Yasbin, 2002; Lewis, 2003).

Posteriormente, en 1961 se celebró la Reunión Técnica sobre Exploración e Introducción de Plantas, impulsada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), considerada el punto de partida en relación con la legislación para el manejo de los recursos genéticos en regiones megadiversas. Posteriormente, se desarrollaron otras actividades, con el fin de diseñar y establecer las directrices internacionales para encarar los problemas técnicos relacionados con la recolección, conservación, caracterización y evaluación de los recursos fitogenéticos, así como su disponibilidad y utilización sostenible (Segundo Informe Nacional sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación, 2008).

Con el pasar del tiempo, inicio de la década de los 70 del siglo pasado, y con la afinación de las técnicas básicas aplicadas a la genética moderna, se logró el aislamiento de *genes*⁴ y la modificación de éstos, con el fin de “copiarlos” y “pegarlos” en cualquier blanco de interés para el humano (Jackson *et al.*, 1972; Gepts, 2002; La Rosa *et al.*, 2006). Posteriormente, se entendió que la tecnología poseía inmensas aplicaciones industriales, por lo que fueron desarrollados productos comerciales específicos, tales como medicamentos y aditivos alimenticios, bacterias, cultivos y animales modificados genéticamente por la vía de *ingeniería genética*⁵, entre otros (Grace, 1998; Muñoz, 1998; Kennedy, 1999; Lleras, 2002; Martínez, 2002; EMBO Report, 2005; Batista, Burachick y Rubinstein, 2007). Desde entonces, el crecimiento en el número y variedad de organismos resultantes de la aplicación de la *Biotecnología Moderna*⁶ (BM), ha aumentado significativamente año tras año (James, 2013).

¹ Rama de la biología que estudia las leyes de la herencia y todo lo relacionado con ella (Griffith *et al.*, 2002).

² Molécula biológicamente activa, formada por dos hebras contentivas de nucleótidos enlazados entre sí, formando una doble hélice. Contiene la información genética de un organismo vivo, la cual es transmitida de una generación a la siguiente de manera semi-conservativa (Streips y Yasbin, 2002).

³ De allí el carácter de molécula universal.

⁴ Secuencia de ADN que codifica las características de la herencia de un organismo vivo (Griffith *et al.*, 2002).

⁵ Conjunto de técnicas que permiten alterar el genoma de un individuo, de forma dirigida y controlada, añadiendo, eliminando o modificando sus genes (Griffith *et al.*, 2002).

⁶ El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (2000), la define como: “Técnicas *in vitro* del ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica que superan las

Como es evidente, en el desarrollo de estas nuevas tecnologías la sociedad ha manifestado diferentes emociones que van desde la aceptación total de los *organismos resultantes de la aplicación de la BM*⁷, y sus derivados, hasta el total rechazo de los mismos (Monteagudo, 2002; Michelangeli, 2003; Díaz, 2004). Por ello, una serie de investigadores estadounidenses, reunidos en California (1972), desarrollan el “Acuerdo de Asilomar”, sentándose así las bases de las preocupaciones éticas y filosóficas derivadas por la manipulación del ADN.

Posteriormente, se entra en un período de receso en cuanto a la adopción de instrumentos legales específicos en la materia, y la misma pasa a ser parte importante de la agenda pública en 1992, donde es adoptado en Nairobi, Kenia, el *Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB)*⁸. Posteriormente este documento se abrió a la firma en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo, celebrada en Río de Janeiro, Brasil, el mismo año (Mackenzie *et al.*, 2004).

El CDB, contiene tres disposiciones específicas en materia de *Organismos Vivos Modificados (OVM)*⁹, una de ella generó las bases para negociar un protocolo de *bioseguridad*¹⁰, indicando la idea de establecer o mantener los medios para regular, administrar o controlar los riesgos derivados de la utilización y liberación de los OVM como resultado de la biotecnología que es probable tengan repercusiones ambientales adversas que puedan afectar a la conservación de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana (Mackenzie *et al.*, 2004).

La decisión II/5 de la Conferencia de las Partes en el CDB, la cual fue celebrada en Indonesia (1995), acordó la elaboración de un protocolo sobre seguridad de la biotecnología, centrado específicamente en el movimiento transfronterizo de cualquier OVM, pues los países se comprometieron en elaborar un protocolo sobre seguridad de la biotecnología, centrado específicamente en el movimiento transfronterizo de cualquier OVM resultante de la BM que pueda tener efectos adversos para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, que establezca en particular, para su examen, procedimientos adecuados para un acuerdo fundamentado previo (Mackenzie *et al.*, 2004).

Es así como se desarrolla el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, el hijo menor del CDB encargado de contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización segura de los OVM resultantes de la aplicación de la BM, el cual se centra en los riesgos a la diversidad biológica, la salud humana y hace especial

barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional”.

⁷ Denominados también Organismos Modificados Genéticamente [OMG], Organismos Vivos Modificados [OVM] o transgénicos.

⁸ Ratificado por la República de Venezuela, según Gaceta Oficial Extraordinario N° 4780 del 12 de septiembre de 1994.

⁹ El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (2000), los define como: “Cualquier organismo que posea una nueva combinación de material genético y que se haya obtenido mediante la aplicación de la BM”.

¹⁰ También conocido como seguridad de la BM, se define como el conjunto de acciones o medidas de seguridad requeridas para prevenir o minimizar los efectos potenciales adversos sobre los ecosistemas, la diversidad biológica y sus componentes, resultantes de la aplicación de la BM (Artículo 12 de la Ley de Gestión de Diversidad Biológica, Gaceta Oficial N° 39.070 del 01 de diciembre de 2008).

énfasis en los movimientos transfronterizos de estos organismos. Venezuela adoptó este convenio en 2000 y lo ratificó en 2002, según la Ley N° 80 publicada en Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.355 del 02 de enero de 2002; el mismo entró en vigencia en septiembre de 2003, por lo que lo dispuesto en el debe ser cumplido por las Partes firmantes del PCB.

Política sobre Seguridad de la BM en el país

Los OVM son concebidos por el Estado venezolano como problema, ya que desde su óptica inciden en la desaparición de especies autóctonas, generan dependencia tecnológica y por tanto representan una amenaza a la soberanía colectiva y nacional. En este mismo orden de ideas, la Estrategia Nacional para la Conservación de la Diversidad Biológica (2008), indica que los OVM representan una amenaza potencial para la conservación de la diversidad biológica, por la contaminación de especies o variedades autóctonas, a través de la transferencia de transgenes, pérdida de soberanía alimentaria y de valores ancestrales y culturales respetuosas del ambiente. Adicionalmente, según un Acuerdo jurídicamente no vinculante, el país rechaza el uso de OVM producidos por las transnacionales de la alimentación y la industria farmacéutica, sin conocer sus efectos sobre los cultivos, la salud y la vida (Acuerdo con Motivo del Día Internacional de la Diversidad Biológica, Gaceta Oficial N° 38.942 del 30 de mayo de 2008).

Nuestro país ha dado tímidos pasos en la generación de instrumentos jurídicos para orientar las políticas nacionales hacia un uso sustentable de la diversidad biológica y sus componentes, y muy especialmente en materia de OVM, por ello en el Artículo 52 de la Ley de Gestión de Diversidad Biológica queda clara la situación actual de país, al señalarse que el Estado prohíbe la transferencia, utilización y liberación de OVM hasta tanto se demuestre su inocuidad para la conservación y utilización sustentable de la diversidad biológica y sus componentes. Así mismo, el citado Artículo indica que la gestión con OVM se podrá realizar bajo condiciones de manejo confinado, de conformidad con lo establecido en tal Ley.

La regulación sobre Seguridad de la BM en el país

La República Bolivariana de Venezuela está sujeta a una serie de disposiciones legales, administrativas y procedimentales relacionadas con los usos, manejos, transferencia y utilización de los organismos resultantes de la aplicación de la BM. Los instrumentos jurídicos nacionales son diversos y todos parten de los postulados constitucionales para la ratificación de los convenios internacionales, integrando convenios multilaterales y bilaterales, tratados; leyes orgánicas y ordinarias, acuerdos, resoluciones y decretos de carácter nacional. Todos persiguen un único fin, el cual está referido a la utilización sustentable de los recursos genéticos, la conservación de la diversidad biológica, el eco-socialismo y la protección de los conocimientos tradicionales y ancestrales de los pueblos y comunidades indígenas y locales, entre otros.

Constitución de la República Bolivariana de Venezuela

La Constitución de la República Bolivariana de Venezuela (*Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela*¹¹ N° 5.453, del 24 de marzo de 2000) establece la soberanía que ejerce la República sobre los recursos genéticos, los productos derivados y los componentes intangibles, tal como se señala en su Título II, Capítulo X, Artículo 11.

¹¹ En lo adelante GORBV

En el Título III, Capítulo VI, De los Derechos Culturales y Educativos, el Artículo 110 señala que el Estado reconocerá el interés público de la ciencia, la tecnología, el conocimiento, la innovación y sus aplicaciones y los servicios de información necesarios por ser instrumentos fundamentales para el desarrollo económico, social y político del país, así como para la seguridad y soberanía nacional. Para el fomento y desarrollo de esas actividades, el Estado destinará recursos suficientes y creará el sistema nacional de ciencia y tecnología de acuerdo con la ley. El sector privado deberá aportar recursos para los mismos. El Estado garantizará el cumplimiento de los principios éticos y legales que deben regir las actividades de investigación científica, humanística y tecnológica.

Por su parte en el Capítulo VIII, del mismo Título, Artículo 120, indica que toda actividad susceptible de generar aprovechamiento dentro de los pueblos y comunidades indígenas, debe realizarse sin lesionar la integridad cultural, social y económica de los mismos. Así mismo, el Artículo 124, señala que el Estado venezolano garantizará la protección a la propiedad intelectual colectiva de los conocimientos tradicionales, tecnologías e innovaciones de los pueblos indígenas. Adicionalmente, este mismo Artículo, resalta que las actividades relacionadas con recursos genéticos y los conocimientos asociados a ellos, deben perseguir beneficios colectivos; e indica, muy especialmente, la prohibición de patentar estos recursos y los conocimientos ancestrales ligados a ellos.

En el Título III Capítulo IX, de los Derechos Ambientales, Artículo 127, se expone la obligatoriedad de proteger el ambiente, la diversidad biológica y sus componentes, resaltando que *“Es un derecho y un deber de cada generación proteger y mantener el ambiente en beneficio de sí misma y del mundo futuro”*. Por otra parte, este mismo Artículo señala que *“El Estado protegerá el ambiente, la diversidad biológica, los recursos genéticos, los procesos ecológicos, los parques nacionales y monumentos naturales y demás áreas de especial importancia ecológica”*; y hace especial referencia con que el *“genoma¹² de los seres vivos no puede ser patentado”*. Como se entiende, todo aquello relacionado con uso, manejo, transferencia y utilización de los recursos genéticos, y los conocimientos tradicionales y ancestrales ligados a ellos, están legalmente basados en este Artículo de la Constitución Bolivariana; también este resalta la importancia de la participación de los ciudadanos, mediante la acción derecho-deber en materia de conservación del ambiente.

En el Título III Capítulo IX, en su Artículo 128 dispone que el Estado, con la participación de las comunidades organizadas, deba desarrollar una política de ordenación territorial, atendiendo a las realidades ecológicas, geográficas, demográficas socioculturales y económicas, como marco del desarrollo sustentable.

Por su parte, el Artículo 129 ordena que toda actividad humana, susceptible de generar daños a los ecosistemas deberá estar acompañada previamente de un estudio de impacto ambiental y sociocultural y que en cualquier contrato de aprovechamiento de recursos naturales que celebre la República, se considera tácitamente la obligación de conservar el equilibrio ecológico, la transferencia tecnológica y la restauración del ambiente alterado.

El Título VI, Capítulo I, Artículo 305 indica que el Estado promoverá la agricultura sustentable como base estratégica del desarrollo rural integral, a fin de garantizar la seguridad alimentaria de la población y el Artículo 306 señala que la seguridad de la nación debe estar fundamentada en la corresponsabilidad entre el Estado y la sociedad

¹² Conjunto total de genes que posee un organismo vivo.

para dar cumplimiento a los principios de independencia, democracia, igualdad, paz, libertad, justicia, solidaridad, promoción y conservación ambiental y afirmación de los derechos humanos, así como en la satisfacción progresiva de las necesidades individuales y colectivas de los venezolanos y venezolanas sobre las bases de un desarrollo sustentable y productivo de plena cobertura para la comunidad nacional.

El Artículo 326 indica que la seguridad de la Nación se fundamenta en la corresponsabilidad entre el Estado y la sociedad civil para dar cumplimiento a los principios de independencia, democracia, igualdad, paz, libertad, justicia, solidaridad, promoción y conservación ambiental y afirmación de los derechos humanos, así como en la satisfacción progresiva de las necesidades individuales y colectivas de los venezolanos y venezolanas, sobre las bases de un desarrollo sustentable y productivo de plena cobertura para la comunidad nacional. El principio de la corresponsabilidad se ejerce sobre los ámbitos económico, social, político, cultural, geográfico, ambiental y militar.

Finalmente, el Artículo 327 expresa que la atención a las fronteras es prioritaria en el cumplimiento y aplicación de los principios de seguridad de la Nación. A tal efecto, se establece una franja de seguridad de fronteras cuya amplitud, regímenes especiales en lo económico y social, poblamiento y utilización serán regulados por la ley, protegiendo de manera expresa los parques nacionales, el hábitat de los pueblos indígenas allí asentados y demás áreas bajo régimen de administración especial.

Leyes específicas que regulan la materia de seguridad de la BM

Ley Aprobatoria del Convenio sobre la Diversidad Biológica (GORBV Extraordinario N° 4780 del 12 de septiembre de 1994). Dicho Convenio fue el primer acuerdo mundial integral que abordó todos los aspectos de la biodiversidad. Automáticamente al Venezuela ratificar el CDB el mismo pasó a formar parte del ordenamiento jurídico nacional, el cual en líneas generales proporciona un enfoque holístico para la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y la participación justa y equitativa en los beneficios provenientes del uso de los recursos genéticos. En sus artículos 8g. Conservación *in situ*, 10b. Utilización sostenible de los componentes de la diversidad biológica y 19. Gestión de la Biotecnología y distribución de beneficios el Convenio establece lo siguiente:

“Artículo 8g.

Cada Parte Contratante, en la medida de lo posible y según proceda:

Establecerá o mantendrá medios para regular, administrar o controlar los riesgos derivados de la utilización y la liberación de OVM como resultado de la biotecnología que es probable tengan repercusiones ambientales adversas que puedan afectar a la conservación y a la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana.”

“Artículo 10b.

Cada Parte Contratante, en la medida de lo posible y según proceda, adoptará medidas relativas a la utilización de los recursos biológicos para evitar o reducir al mínimo los efectos adversos para la diversidad biológica”.

“Artículo 19.

1. Cada Parte Contratante adoptará medidas legislativas, administrativas o de política, según proceda para asegurar la participación efectiva en las actividades de investigación sobre biotecnología de las Partes Contratantes, en particular los

países en desarrollo, que aportan recursos genéticos para tales investigaciones, y, cuando sea factible, en esas Partes Contratantes.

2. Cada Parte Contratante adoptará todas las medidas practicables para promover e impulsar en condiciones justas y equitativas el acceso prioritario de las Partes Contratantes, en particular los países en desarrollo, a los resultados y beneficios derivados de las biotecnologías basadas en recursos genéticos aportados por esa Parte Contratantes. Dicho acceso se concederá conforme a condiciones determinadas por mutuo acuerdo.
3. Las partes estudiarán la necesidad y las modalidades de un protocolo que establezca procedimientos adecuados, incluido en particular el consentimiento fundamentado previo, en la esfera de la transparencia, manipulación y utilización de cualesquiera organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología que puedan tener efectos adversos para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica
4. Cada Parte Contratante proporcionará, directamente o exigiéndoselo a toda persona natural o jurídica bajo su jurisdicción que suministre los organismos a los que se hace referencia en el párrafo 3, toda la información disponible acerca de las reglamentaciones relativas al uso y la seguridad requeridas por esa Parte Contratante para la manipulación de dichos organismos, así como toda la información disponible sobre los posibles efectos adversos de los organismos específicos de que se trate, a la Parte Contratante en la que esos organismos hayan de introducirse”.

La Ley de Tierras y Desarrollo Agrario (GORBV N° 37.323 del 13 de Noviembre de 2001), tiene por objeto establecer las base del desarrollo rural integral y sustentable; entendido éste como el medio fundamental para desarrollo humano y crecimiento económico del sector agrario dentro de una justa distribución de la riqueza y una planificación estratégica, democrática y participativa, eliminado el latifundio..., asegurando la biodiversidad, seguridad alimentaria y la vigencia efectiva de los derechos de protección ambiental y agroalimentación de la presente y futuras generaciones” (Artículo 1). Así mismo, establece en su Artículo 15, numeral 3, que la incorporación al proceso productivo de los sujetos beneficiarios garantizará el acceso a los *germoplasmas*¹³ para establecer plantaciones.

Ley Aprobatoria del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (Ley N° 80, GORBV N° 37.355 del 02 de enero de 2002). La adopción de este Protocolo, aprobado en Montreal, Canadá en el año 2000 y ratificado por Venezuela en 2002, proporciona un marco normativo internacional para conciliar las necesidades de protección del comercio y del medio ambiente en una industria mundial en rápido crecimiento, la industria de la biotecnología.

El Objetivo del Protocolo según su artículo 1, es el siguiente:

“De conformidad con el enfoque de precaución que figura en el Principio 15 de la Declaración de Río sobre el medio Ambiente y el Desarrollo, el objetivo del presente Protocolo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en

¹³ Individuo o grupo de individuos que representan a un genotipo, cultivar o variedad de la especie.

cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos”.

El Protocolo, no afectará en modo alguno a la Soberanía de los Estados sobre su mar territorial, ni a los derechos soberanos ni la jurisdicción sobre sus zonas económicas exclusivas y sus plataformas continentales, ni al ejercicio por los buques o aeronaves de todos los Estados de los derechos y las libertades de navegación de conformidad con el derecho internacional.

Ninguna disposición del Protocolo, se interpretará en el sentido de restringir el derecho de una parte a adoptar medidas más estrictas para proteger la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica que las establecidas en el Protocolo.

En cuanto a su ámbito de aplicación, el Protocolo se aplicará al movimiento transfronterizos, el tránsito, la manipulación y la utilización de todos los organismos vivos modificados que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica y la salud humana, con las excepciones establecida en los artículos 5 y 6, referidas al movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados que son productos farmacéuticos destinados a los seres humanos que ya estén contemplados en otros acuerdos u organizaciones internacionales, sin perjuicio de lo establecido en el artículo 4, Organismos vivos modificados en tránsito, sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 4 y sin menoscabar el derecho de una parte de reglamentar el transporte de organismos vivos modificados a través de su territorio y de comunicar al Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología y al Movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados destinados a uso confinado realizado de conformidad con las normas de la parte de importación, sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 4 y sin menoscabar el derecho de una parte de someter a todos los OVM a una evaluación del riesgo con antelación a la adopción de decisiones sobre la importación y de establecer normas para este uso dentro de su jurisdicción.

Finalmente es conveniente añadir, que el Protocolo establece la obligación de adoptar normas en la esfera de la responsabilidad y compensación por daños y, remite a los mecanismos financieros del Convenio, la actuación de la Conferencia de las Partes como reunión de las partes, los órganos subsidiarios, la relación con el Convenio de Diversidad Biológica, la obligación de establecer los mecanismos de cumplimiento y de evaluación y revisión, la imposibilidad de formular reservas, la forma de efectuar su denuncia y contiene tres anexos, sobre: Información requerida en las Notificaciones, Información sobre los OVM y sobre Evaluación del riesgo.

La Ley de Semillas y Material para la reproducción animal e insumos biológicos (GORBV N° 37.552 del 18 de octubre de 2002) declara de interés nacional las actividades de obtención, investigación, producción, abastecimiento, comercialización y en general, todas las relacionadas a las mismas que tenga por efecto el uso de semillas, materiales para la reproducción animal e insumos biológicos susceptibles de aprovechamiento agroproductivo. En el Capítulo II de los Organismos Transgénicos u OVM, se establece que:

“Todo género susceptible de aprovechamiento agroproductivo a título de: semilla, material para reproducción animal o insumo biológicos, deberá ser evaluado genéticamente por el Instituto Nacional de Semillas y Material para Reproducción Animal previo a su liberación, producción o comercialización o

cualquier otro uso, a fin de determinar si constituyen organismos transgénicos o modificados genéticamente o provienen de este tipo de organismo (Artículo 14)”.

La Ley Orgánica de Ciencia, Tecnología e Innovación (GORBV N° 38.242 del 03 de agosto de 2005), tiene por objeto desarrollar los principios orientadores que en materia de ciencia, tecnología e innovación que establece la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, organizar el Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, definir los lineamientos que orientaran las políticas y estrategias para la actividad científica, tecnológica y de innovación, a fin de fomentar la capacidad para la generación, uso y circulación del conocimiento y de impulsar el desarrollo nacional.

La Ley Orgánica de Pueblos y Comunidades Indígenas (GORBV N° 38.344 del 27 de diciembre de 2005). Esta ley desarrolla los derechos de los pueblos y comunidades indígenas consagrados en la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela y en los diversos tratados, pactos, y convenios internacionales suscritos por la República en esa materia. Se basa en el principio del respeto a la integridad cultural de los pueblos indígenas, entendida de manera amplia y cubriendo todos los aspectos que abarca. El Capítulo II de la mencionada ley trata de la Consulta Fundamentada Previa e Informada en la cual se establece que:

“Toda actividad susceptible de afectar directa o indirectamente a los pueblos y comunidades indígenas, deberá ser consultada con los pueblos y comunidades indígenas involucrados. La consulta será de buena fe, tomando en cuenta los idiomas y la espiritualidad, respetando la organización propia, las autoridades legítimas y los sistemas de comunicación e información de los integrantes de los pueblos y comunidades indígenas involucrados, conforme al procedimiento establecido en esta Ley. Toda actividad de aprovechamiento de recursos naturales y cualquier tipo de proyectos de desarrollo a ejecutarse en hábitat y tierras indígenas, estará sujeta al procedimiento de información y consulta previa, conforme a la presente Ley”.

Ley de Salud Agrícola Integral (GORBV extraordinario N° 5890 del 31 de julio de 2008), indica que por salud agrícola integral de animales, vegetales, productos y subproductos de ambos orígenes, suelo, aguas, aire, personas y la estrecha relación entre ellos, incorporando principios de la ciencia agroecológica que promuevan la seguridad y soberanía alimentaria y la participación popular, a través de la formulación, ejecución y control de políticas, planes y programas para la prevención, control y erradicación de plagas y enfermedades.

Esta Ley en su Capítulo IX de los Organismos Vivos Modificados, en su Artículo 46 señala lo siguiente:

“El Ejecutivo Nacional, a través de sus órganos y entes competentes, regulará la liberación al ambiente, producción, distribución, intercambio, comercialización en todo el territorio nacional de OVM, productos y subproductos, dada la ausencia de certeza científica sobre la inocuidad ambiental y consumo de estos productos y sobre los posibles daños irreversibles que pudiera provocar a la salud de las personas o al equilibrio natural. Excepcionalmente por razones estratégicas en materia de salud y

cuando se garantice el cumplimiento de normas de bioseguridad, se permitirá la investigación con OVM en absoluto confinamiento”.

La Ley de Beneficios y Facilidades de Pago para las Deudas Agrícolas de Rubros Estratégicos para la Seguridad y Soberanía Alimentaria (GORBV extraordinario N° 5891 del 31 de julio de 2008), este decreto-Ley constituye una herramienta legal de apoyo directo al pequeño y mediano productor que se encuentra imposibilitado de dar continuidad efectiva y eficiente a su actividad, pues su situación financiera le impide solicitar nuevos préstamos que lo coloquen en una situación de igualdad frente a productores de mayor envergadura. Esta dirigido al fomento e incentivo de la actividad agrícola, de acuerdo con la orden constitucional de especial protección a dicho sector, consagrada en el artículo 305, y responde a las políticas agrícolas nacionales y su aplicación a los fines de la inmediata reactivación de numerosas unidades productivas que se encuentran subutilizadas por falta del apoyo financiero indispensable para su idóneo aprovechamiento.

La Ley Orgánica de Seguridad y Soberanía Agroalimentaria (GORBV Extraordinario N° 5.891 del 31 de julio de 2008) tiene por objeto brindar una herramienta jurídica en manos del Estado y de la sociedad en su conjunto que permita la planificación normativa, estratégica, democrática, participativa y territorializada de la producción agrícola, también la gestación y desarrollo de espacios para la producción y distribución de bienes, servicios y riquezas cónsonos con el proyecto de sociedad plasmado en nuestra constitución, al tiempo que se garantiza el abastecimiento y distribución equitativa y justa de alimentos a toda la población. La ley establece un marco jurídico estable que oriente las múltiples variantes de la actuación de los Poderes del Estado y de las ciudadanas y ciudadanos, a través del desarrollo ordenado de actos normativos (leyes y decretos) y administrativos (resoluciones ministeriales e interministeriales) que propendan al logro de los objetivos definidos en el ordenamiento orgánico y colme las deficiencias que en este sentido, presenta la actual normativa vigente. La normativa establece los principios esenciales de seguridad y soberanía alimentaria, de la disponibilidad y acceso de los alimentos para toda la población, la creación y planificación de las reservas estratégicas, incluyendo los casos de contingencias; la participación en la distribución e intercambio de productos agroalimentarios; la participación social en la planificación de la producción agrícola sustentable; del intercambio y comercio justo nacional e internacional; de la inocuidad y calidad en la producción interna de la inocuidad y calidad en los alimentos importados exportados; de la investigación en materia agroalimentaria; de la educación agroalimentaria de la cultura, hábitos y patrones de alimentación; de los programas de formación y control higiénico en la manipulación de alimentos y de la inspección, fiscalización y sanciones si fuesen necesarias.

La Ley de Gestión de la Diversidad Biológica (GORBV N° 39.070 del 01 de diciembre de 2008), en sus disposiciones generales señala que el objeto de la Ley regulará a la diversidad biológica en sus componentes, comprendiendo los genomas naturales o manipulados, material genético, y sus derivados, especies, poblaciones, comunidades y los ecosistemas presentes en los espacios continentales, insulares, lacustres y fluviales, mar territorial, áreas marítimas interiores y el suelo, subsuelo y espacios aéreos de los mismos, en garantía de la seguridad y soberanía de la nación, para alcanzar el mayor bienestar colectivo, en el marco del desarrollo sustentable.

Según el Artículo 2, a los efectos de dicha Ley, la gestión de la diversidad biológica en materia de bioseguridad se encuentran señalados en el numeral 10 el cual indica la

adopción de acciones y medidas a los fines de regular el acceso a los recursos genéticos y sus derivados, el numeral 11 relacionado con la adopción de acciones y medidas en materia de bioseguridad concernientes a los OVM para prevenir efectos adversos sobre la diversidad biológica y el numeral 12 que indica la adopción de acciones y medidas en materia de biocomercio concernientes a los patrimonios genéticos y a los OVM para prevenir efectos adversos sobre la diversidad biológica.

El Título V de la bioética, la biotecnología y la bioseguridad, Capítulo II de la biotecnología, señala en su Artículo 47 que el Estado establecerá las medidas para prevenir y evitar cualquier amenaza a la diversidad biológica y sus componentes, derivada del uso de la biotecnología, en especial aquellas relacionadas con el desarrollo, el manejo, el transporte, la utilización, la transferencia y la liberación de los organismos resultantes de la aplicación de la BM. Por su parte, el Artículo 48, señala que el Estado promoverá el desarrollo biotecnológico del país como un instrumento de desarrollo sustentable, haciendo énfasis en la conservación de la diversidad biológica y sus componentes, la salud y la seguridad agroalimentaria.

El Artículo 49, señala que todas aquellas personas naturales o jurídicas, públicas o privadas, que realicen en el país actividades con OVM, quedan sujetos al control de la autoridad, a cuyos fines deberán proveerse de los instrumentos de control establecidos en la presente Ley y demás normativas aplicables. Mientras que el Artículo 51 indica el ámbito de regulación de las biotecnologías, así como el alcance de uso de las mismas. El Artículo 53, señala que toda persona natural o jurídica, pública o privada, nacional o extranjera que pretenda realizar cualquier actividad relacionada con OVM deberá cumplir con la normativa vigente en materia de bioseguridad.

Finalmente, los Artículos 54 y 55 están relacionados con la evaluación y gestión de riesgos, donde se señala que tales procedimientos y mecanismos se realizarán de acuerdo a lo establecido en el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del CDB.

Otros instrumentos jurídicos que regulan la materia de seguridad de la BM

Normas sobre Evaluación Ambiental de Actividades Susceptibles de Degradar el Ambiente (GORV N° 35.946 del 25 de abril de 1996). En este instrumento se dispone que la evaluación ambiental se cumplirá como parte del proceso de toma de decisiones en la formulación de políticas, planes, programas y proyectos de desarrollo, a los fines de la incorporación de la variable ambiental en todas sus etapas, e indica tal y como se encuentra señalado en el Artículo 129 de la Constitución que las partes interesadas deben presentar el respectivo estudio de impacto ambiental y socio-cultural.

Normas sobre Coordinación de Competencias en materia de Tramitación de Contratos de Acceso a los Recursos Genéticos (Resolución N° 95 del 23 de agosto de 2001; publicada en GORBV N° 37.268, del 24 de agosto de 2001). Esta norma, contempla los mecanismos para la coordinación de las actividades que, en materia de recursos genéticos, desarrollan las distintas dependencias del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente.

Comisión Ministerial de Acceso a los Recursos Genéticos (Resolución N° 95 del 23 de agosto de 2001; publicada en GORBV N° 37.268, del 23 de agosto de 2001). La Comisión de Acceso a los Recursos Genéticos evalúa las solicitudes y de aprobarse en el seno de la Comisión se firma un contrato de acceso a los recursos genéticos, el cual es un

acuerdo entre la Autoridad Nacional Ambiental, en este caso el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, en representación del Estado y una persona o institución, el cual establece los términos y condiciones para el acceso a recursos genéticos, sus productos derivados y, de ser el caso, el componente intangible asociado. Cuenta para su funcionamiento con un Reglamento Interno de la Comisión de Acceso a los Recursos Genéticos (Resolución N° 163, Publicada en GORBV N° 37.894, del 09 de marzo de 2004).

El Código de Bioética y Bioseguridad (MCT/FONACIT, 2002) tiene como propósito establecer los lineamientos filosóficos básicos y las normas que de ellas se derivan, en el ámbito de la bioética y bioseguridad aplicados a la investigación. Está estructurado en tres partes: principio de Bioética y Bioseguridad; normas de bioética y bioseguridad para la investigación con organismos vivos y el ambiente, y normas de la comisión de Bioética y Bioseguridad.

Este código, define a la bioseguridad como el conjunto de acciones o medidas de seguridad requeridas para prevenir o minimizar los efectos adversos potenciales derivados de la investigación sobre organismos vivos. Se contempla dos ámbitos: uno convencional, referido a las previsiones y regulaciones del comportamiento humano en el laboratorio, el cual abarca el diseño, manejo, destino y salida de los agentes biológicos, y otro específicamente referido a las actividades de la biotecnología moderna, que trata entre otros aspectos la utilización de los recursos genéticos para la obtención de Organismos Modificados Genéticamente (OMG), agentes biológicos peligrosos y organismos exóticos, bajo condiciones de confinamiento o de liberación al ambiente.

Decreto de Creación de la Comisión Nacional de Bioseguridad (GORBV N° 38.392, Decreto N° 4.334, del 07 de marzo de 2006). Considerando que la República es parte del CBD y del PCB, y que para el adecuado manejo de la seguridad de la biotecnología, y en especial para la regulación y el control de los OVM, sus derivados y productos que los contengan, es necesario el establecimiento de mecanismos de coordinación institucional, participación ciudadana y asesoría técnico-jurídica calificada, se creó la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB), con carácter permanente y *ad honorem*, como organismo técnico-científico asesor del Ejecutivo Nacional en las actividades vinculadas con OVM, sus derivados y productos que los contengan, resultantes de la aplicación de la biotecnología y bioseguridad, relacionados con las áreas de ciencia, tecnología e innovación, salud, sanidad animal y vegetal, producción agropecuaria, educación, defensa y ambiente.

El Artículo 7, numeral 3 señala la obligatoriedad de los miembros de la CNB de participar en la elaboración del Reglamento sobre Bioseguridad y proponer las modificaciones que considere convenientes, así como proponer los mecanismos que permitan la efectiva aplicación de los instrumentos legales pertinentes en materia de seguridad de la BM, así como de la Ley Aprobatoria del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del CDB.

Resolución Conjunta por medio de la cual se dicta el Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Bioseguridad (GORBV N° 372.501 del 27 de octubre de 2009). El citado reglamento tiene por objeto establecer las normas y procedimientos que regirán la integración, organización y funcionamiento interno de la CNB, las cuales son de obligatorio cumplimiento para sus integrantes. El Reglamento establece en su Artículo 8, numeral 6 que los miembros de la CNB deben contribuir con la elaboración de informes,

documentos, minutas y otras actividades relacionadas con la CNB. Por su parte, en el Artículo 11, numeral 3, se indica textualmente lo establecido en el Artículo 7, numeral 3 del Decreto de la Creación de la CNB.

Protocolo de Nagoya – Kuala Lumpur sobre Responsabilidad y Compensación Suplementario al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, 2010. El objetivo del presente Protocolo Suplementario es contribuir a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, proporcionando normas y procedimientos internacionales en la esfera de la responsabilidad y compensación en relación con los organismos vivos modificados.

Define como operador a cualquier persona que tenga el control directo o indirecto del OVM, término que podría incluir, según proceda y según lo determine la legislación nacional, entre otros, el titular del permiso, la persona que colocó el OVM en el mercado, el desarrollador, el productor, el notificador, el exportador, el importador, el transportista o el proveedor.

Se aplica a los daños resultantes de los organismos vivos modificados cuyo origen fue un movimiento transfronterizo. Los organismos vivos modificados a los que se hace referencia son aquellos:

- a) destinados a uso directo como alimento humano o animal o para procesamiento;
- b) destinados a uso confinado;
- c) destinados a su introducción deliberada en el medio ambiente.

Este Protocolo Suplementario se aplica a los daños resultantes de los movimientos transfronterizos involuntarios, así como a los daños resultantes de los movimientos transfronterizos ilícitos.

El mismo no ha sido firmado y ratificado por la República Bolivariana de Venezuela, debido a que se considera un documento que mercantiliza los intereses relacionados con los daños asociados al movimiento transfronterizo de OVM, pues entre sus obligaciones indica las garantías financieras que deben someterse las Partes cuando ocurran movimientos ilícitos o involuntarios de OVM, además de la responsabilidad de los Estados por hechos internacionalmente ilícitos.

La Gestión de la Bioseguridad en la República Bolivariana de Venezuela

Tal y como se encuentra establecido en diferentes instrumentos legales nacionales, la Autoridad Nacional encargada de regular las actividades de uso, manejo, transferencia y utilización de los organismos resultantes de la aplicación de la BM, es el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. Por ello, en este Ministerio se encuentran oficializados los Puntos Focales Nacional del Convenio sobre la Diversidad Biológica, del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología y del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología del PCB. Adicionalmente, desde la Oficina Nacional de Diversidad Biológica, del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, coordinación con las demás dependencias de ese Ministerio, así como del resto de las autoridades del Estado venezolano ligadas a la materia, se vela por el cumplimiento de la normativa vigente existente sobre seguridad de la biotecnología en el país.

Por ello, la Oficina ha trabajado en el diseño de medidas legales, administrativas, procedimentales y de percepción pública y participación comunitaria en materia de OVM,

todo con el fin de adaptar el nuevo sistema económico de la nación a la época actual de conocimientos, para construir un sistema nacional de bioseguridad basado en la sustentabilidad ambiental, social, cultural y política que necesita el país.

Adicionalmente, se señala que existe una Comisión Nacional de Bioseguridad, integrada por los Ministerios del Poder Popular para el Ambiente (como autoridad rectora en la materia), de Agricultura y Tierras, de Comercio, de Salud, de Ciencia, Tecnología e Innovación y de Alimentación, mientras que el sector no gobierno está representado por las Universidades e Institutos Públicos de Educación Superior, del Sector Industrial y comercial de productos agrícolas, alimenticios, medicinales y farmacéuticos, del Sector agrícola, que comprende tanto a pequeños, medianos y grandes productores, especialmente de los subsectores producción animal y vegetal agroalimentarios y un representante de las comunidades organizadas.

El camino hacia el diseño del Reglamento sobre Seguridad de la BM para la República Bolivariana de Venezuela

Como se dejó claro en las ideas desarrolladas anteriormente, en Venezuela existe un marco normativo que se relaciona directa e indirectamente con el tema de bioseguridad; sin embargo, es necesario contar con un instrumento jurídico que regule de manera clara y precisa todo lo relativo al manejo seguro de OVM, sus impactos y riesgos por la manipulación, liberación y comercio, ello atendiendo a las políticas de Estado, la institucionalidad y las necesidades de país.

En 2000, un grupo de trabajo intraministerial del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, se reunió bajo la coordinación de la Oficina Nacional de Diversidad Biológica, y elaboró la propuesta en referencia, la cual fue presentada en el Anexo 5 del Marco Nacional de Bioseguridad de la República Bolivariana de Venezuela (2005). Quizás este documento sirva de partida para que la Comisión Nacional de Bioseguridad, de cumplimiento a lo establecido en el Artículo 7, numeral 3, de la GORBV N° 38.392, Decreto N° 4.334 del 06 de marzo de 2006.

Debe precisarse que, por tratarse de un reglamento de ejecución de ley, debe ser dictado por el Presidente de la República, según se establece en el artículo 236, numeral 10 de la Constitución, de lo cual se desprende que el acto que lo contenga debe ser un Decreto, que de conformidad con lo dispuesto en el artículo 15 de la Ley Orgánica de Procedimientos Administrativos, son los actos administrativos de mayor jerarquía y deberá estar refrendado por los Ministros a quien corresponda la materia, o por todos si es dictado en Consejo de Ministros.

En la elaboración del Proyecto de Reglamento se utilizó un criterio único de ordenación, de acuerdo con el contenido se organizó en títulos o capítulos, los cuales a su vez, se dividen en secciones y éstas en artículos, los cuales reglamentan la materia de una manera más detallada.

A continuación se indica el orden interno del texto del Proyecto de Reglamento desarrollado en 2000:

Capítulo I

Disposiciones Generales: indica aquellas normas que están relacionadas con el contenido del Reglamento, tales como: objeto, actividades que regula, exclusiones y las

definiciones, dejando claro que no debe definirse aquello que es obvio y que no puede dar lugar a confusión (Artículos 1 al 4).

Capítulo II

Marco Institucional: señala a las Autoridades Nacionales Competentes para el control y la fiscalización de OVM, tanto de ejecución como de asesoría, con indicación de sus funciones. Se resalta que las Autoridades señaladas son las que establece el Decreto de Creación de la CNB; adicionalmente, se especifica en ella la creación de la CNB como órgano técnico-científico asesor del Ejecutivo Nacional en materia de Seguridad de la Biotecnología. Se señalan los integrantes, funciones y otros de la Comisión (Artículos 5 al 16).

Capítulo III

Mecanismos de Control.

Sección primera: se indican los aspectos relacionados con las obligaciones de las empresas que realizan actividades con OVM, derivados y productos que los contengan. Se señala que debe existir una ventanilla única por medio de la cual se deben registrar los interesados en realizar actividades con OVM, así como las medidas de bioseguridad requeridas para minimizar los riesgos asociados con el uso de OVM (Artículos 17 al 20).

Sección segunda: señala las obligaciones a las cuales debe estar sometida la persona natural o jurídica, pública o privada, nacional o extranjera que pretenda realizar cualquier actividad con OVM, derivados y productos que los contengan, tal como lo establece la Ley Orgánica de Procedimientos administrativos. Se señala además la documentación que debe acompañar tal solicitud (Artículos 21 y 22), la obligación de la autoridad de informar al solicitante acerca del estado de la revisión de la documentación (Artículo 23), los lapsos para publicar la información en un medio de comunicación de circulación nacional, las evaluaciones de riesgos basadas en los exámenes de la información proporcionada por el solicitante, la clasificación de los riesgos según la magnitud de posible daño y la gestión de riesgos (Artículos 24 al 30).

En esta sección se indican también los plazos para informar al solicitante sobre la decisión final de autorizar el uso de un OVM, así como de los procedimientos administrativos relacionados con una apelación de una decisión tomada por las autoridades competentes (Artículos 31 al 36).

En la sección tercera se desarrollan los elementos relacionados con el etiquetado, resaltando que este procedimiento debe realizar acorde con la naturaleza del producto e indicando de manera visible, clara, concisa y con letra de fácil lectura, empleando tinta indeleble, que se trata de un OVM. Asimismo, se hace la salvedad de que cuando no es posible empacar el producto, debe colocarse una etiqueta declarando la identificación de OVM sobre el mismo (Artículo 37).

Capítulo IV

Tratamiento Confidencial de la Información: según la Propuesta el interesado podrá solicitar a la autoridad que se reconozca la confidencialidad para alguna información específica, básicamente relacionada con la tecnología empleada para la obtención del OVM, con el fin de resguardar y proteger legítimamente los intereses de los desarrolladores de los OVM, así como los medios para hacer cumplir tal mecanismo (Artículos 38 y 40 – 41). Se indica también que los aspectos relacionados con la evaluación y gestión de los riesgos no deben ser declarados como información

confidencial, pues los mismos señalarían las rutas más adecuadas para resguardar de manera efectiva la salud humana y animal, el ambiente y la producción agrícola (Artículo 39).

Disposiciones Transitorias y Finales: se señala que funcionarios de las autoridades competentes podrán realizar visitas, inspecciones y comprobaciones a las personas que se sospeche esté realizando actividades con OVM, y de ser el caso, como estaría conformado el grupo de visita (Artículo 42). También se señalan las sanciones e infracciones según lo explicado en el aparte legal nacional, y finalmente se indican los lapsos para permitir a la industria y a las autoridades adaptarse al nuevo marco de bioseguridad y momento de entrada en vigencia del Reglamento.

Bibliografía consultada

1. **Batista, J., M. Burachick y C. Rubinstein.** 2007. Evaluación de la inocuidad alimentaria de organismos genéticamente modificados: criterios para su aplicación. Publicaciones del Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe y de la Red Regional de Bioseguridad. 53 p.
2. **Bourlag, N.** 2001. Sólo la biotecnología salvará al mundo: a criterio del Microbiólogo y Premio Nobel de la Paz Norman Bourlag. Texas & AM. University.
3. **Conroy, J.** 2002. Revolução biotecnológica: quais caminhos devemos trilhar?. En: Jornal da Associação Nacional de Biossegurança. Rio de Janeiro – Brasil. II – VI: 6 – 7.
4. **Convenio sobre la Diversidad Biológica.** 1992. Documento desarrollado por la Organización de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
5. **Díaz, L.** 2004. Percepción de la biotecnología moderna en el sector profesoral de dos universidades venezolanas. Tesis de grado para optar al título de Ing. Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. 90 p.
6. **EMBO Report.** 2005. Molecular farming for new drugs and vaccines: Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. European Molecular Biology Organization. 6 (7): 593 – 599.
7. **Franklin, R. y R. Gosling.** 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 171: 740 – 741.
8. **Gaceta Oficial Extraordinario N° 4780 del 12 de septiembre de 1994.** Ratificación del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
9. **Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 35.946 del 25 de abril de 1996.** Normas sobre Evaluación Ambiental de Actividades Susceptibles de Degradar el Ambiente.
10. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5.453, del 24 de marzo de 2000.** Constitución de la República Bolivariana de Venezuela.
11. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.268, Resolución N° 95 del 23 de agosto de 2001.** Comisión Ministerial de Acceso a los Recursos Genéticos.
12. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.268, Resolución N° 95 del 23 de agosto de 2001.** Normas sobre Coordinación de Competencias en materia de Tramitación de Contratos de Acceso a los Recursos Genéticos.
13. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.323 del 13 de Noviembre de 2001.** La Ley de Tierras y Desarrollo Agrario.
14. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.355 Ley N° 80 del 02 de enero de 2002.** Ley Aprobatoria del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
15. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.552 del 18 de octubre de 2002.** Ley de Semillas y Material para la reproducción animal e insumos biológicos.
16. **Gaceta Oficial N° 37.355, Ley Aprobatoria N° 80 del 12 de septiembre de 2003.** Aprobación del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
17. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.894, Resolución N° 163, del 09 de marzo de 2004.** Reglamento Interno de la Comisión de Acceso a los Recursos Genéticos.
18. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 38.242 del 03 de agosto de 2005.** Ley Orgánica de Ciencia, Tecnología e Innovación.
19. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 38.344 del 27 de diciembre de 2005.** Ley Orgánica de Pueblos y Comunidades Indígenas.
20. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 38.392, Decreto N° 4.334, del 07 de marzo de 2006.** Creación de la Comisión Nacional de Bioseguridad.

21. **Gaceta Oficial N° 38.942 del 30 de mayo de 2008.** Acuerdo con Motivo del Día Internacional de la Diversidad Biológica.
22. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela extraordinario N° 5891 del 31 de julio de 2008.** Ley de Beneficios y Facilidades de Pago para las Deudas Agrícolas de Rubros Estratégicos para la Seguridad y Soberanía Alimentaria.
23. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela extraordinario N° 5890 del 31 de julio de 2008.** Ley de Salud Agrícola Integral.
24. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela extraordinario N° 5.891 del 31 de julio de 2008.** Ley Orgánica de Seguridad y Soberanía Agroalimentaria.
25. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 39.070 del 01 de diciembre de 2008.** Ley de Gestión de la Diversidad Biológica.
26. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.501 del 27 de octubre de 2009.** Resolución Conjunta sobre el Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Bioseguridad.
27. **Gepts, P.** 2002. A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering. *Crop Sci.* 42:1780–1790
28. **Grace, E.** 1998; *La Biotecnología al desnudo. Promesas y realidades.* Colección Argumentos. Editorial Anagrama. Barcelona, España.
29. **Griffiths, A., J. Miller, D. Suzuki, R. Lewontin, W. Gerbary.** 2002. *Genética.* Editorial Mc Graw-Hill-interamericana. Séptima edición. Madrid, España
30. **Jackson, D., R. Simmons y P. Berg.** 1972. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69 (10): 2904 – 2909.
31. **James, C.** 2011. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2010. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
32. **Kennedy, I.** 1999. Genetically Modified crops: the ethical and social issues. Nuffield's Council Bioethics. European Union. 154p.
33. **La Rosa, J., M. Hernández, J. Vilaragut, L. Pastor, O. Rodríguez, T. Campos, L. García y J. Verderra.** 2006. Organismos vivos modificados: guía para evaluación y gestión de riesgos. Centro Nacional de seguridad Biológica. La Habana – Cuba. 147 p.
34. **Lewis, R.** 2003. Human genetics: concepts and applications. Fifth edition. The Mc Graw Hill Companies. 454 p.
35. **Lleras, M.** 2002. Biotecnología y su aplicación en la agricultura. Empresa Colombiana de Biotecnología Meristemos S.A.
36. **Mackenzie, R., F. Burhenne, A. La Viña, J. Werksman, A. Ascencio, J. Kinderlerer, K. Kummer y R. Tapper.** 2004. Guía explicativa del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. Centro de Derecho Ambiental de la Unión Mundial para la Naturaleza. 318 p.
37. **Martínez, J.** 2002. El vaticano y los verdes ante la ingeniería genética: problemas naturalistas y éticos. Departamento de Filosofía. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.
38. **Michelangeli, C.** 2003. Situación mundial de los OVM y percepción pública de la biotecnología en Venezuela. En: Memorias del I Congreso Venezolano de Genética y Biotecnología Agrícola.
39. **Ministerio del Poder Popular para el Ambiente.** 2005. Documento Borrador del Marco Nacional de Seguridad de la Biotecnología Moderna en la República Bolivariana de Venezuela.
40. **Ministerio del Poder Popular para el Ambiente.** 2008. Estrategia Nacional para la Conservación de la Diversidad Biológica.
41. **Monteagudo, A.** 2002. Percepción pública e influencia de la comunicación social. En: Memorias del International Training Course: Biosafety in Agriculture biotechnology: risk and assessment and public perception. Regional Network on Biosafety.
42. **Muñoz, E.** 1998. La biotecnología ante su espejo: Sociedad, Industria, Desarrollo y Ambiente. Tres imágenes. Documento de trabajo del Instituto de Estudios Avanzados, N° 98 -04, Barcelona, España.
43. **Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.** 2000. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: Texto y Anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
44. **Streips, U. y R. Yasbin.** 2002. Modern microbial genetic. Second edition. Wiley-Liss Inc. 605 p.
45. **Watson, J. y F. Crick.** 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 171: 737 – 738.

Capítulo III

Métodos para la detección, identificación y cuantificación de OVM

Introducción

Según el “International Life Science Institute” (2007), la detección e identificación de un OVM se realiza básicamente por tres motivos: 1) para investigación y verificación de que la transformación transgénica se realizó de manera apropiada, 2) para verificar la correcta identidad de la mercadería que se está comercializando, y de esta manera ejercer los controles de garantía de la calidad y 3) para hacer cumplir normas y/o mandatos nacionales, en cuanto a la decisión de la adopción de productos derivados de la BM, entre los cuales se destaca el etiquetado y el conocimiento del uso de eventos aprobados y no aprobado, hecho que debe hacerse cumplir en los países donde se encuentra aprobado oficialmente el uso de OVM. En este capítulo se hace una descripción detallada de los principales métodos de detección, identificación y cuantificación de OVM, con el fin de dar al lector una aproximación a los términos relacionados con el tema.

1. Identificación “*in silico*”

Utilizando la información disponible en el ciberespacio es posible conocer de forma instantánea, rápida y muy sencilla que OVM se está comercializando a nivel internacional. Esto por qué el PCB en su artículo 21, establece la obligatoriedad de las Partes de desarrollar sus portales web nacionales para dar a conocer sus situaciones sobre los OVM. Por ello, la Secretaría del CDB desarrolló el “Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología (CIISB)” (BCH, por sus siglas en inglés; <http://www.bch.cbd.int>), el cual es un medio para la difusión de la información relacionada con OVM. En este sitio web se pueden consultar, entre otras cosas, leyes reglamentos y directrices nacionales existentes para la aplicación del PCB, acuerdos y arreglos bilaterales internacionales, resúmenes de las evaluaciones de riesgos y las decisiones definitivas sobre importación, exportación o liberación al ambiente de OVM.

También se consulta, casi que de manera obligada, los sitios web denominados 1) GMO Detection Method Database (<http://www.gmdd.shgmo.org>) y 2) Center of Environmental Risk Assessment (<http://www.cera-gmc.org>), de donde se extrae información relacionada con adopción de decisiones, además de que estos portales incluyen información práctica de muchísima utilidad a la hora de desarrollar los ensayos de detección y cuantificación de OVM en el laboratorio. Cabe resaltar que en cualquiera de las tres páginas web es donde normalmente se inicia la tarea de identificación de un OVM, además que toda la información disponible en ellas está totalmente libre (Dong *et. al.*, 2008; Zhang y Guo, 2011).

Normalmente para la búsqueda de los eventos de transformación transgénica en los portales web, los interesados se basan en el uso de los identificadores únicos “IdU” desarrollados por la “Organization for Economic Cooperation Development (OECD)” para plantas transgénicas. Estos “IdU” son como la huella digital electrónica que registra al OVM en el ciber-espacio. Los mismos se integran por un código de 9 caracteres asignado por los desarrolladores de plantas transgénicas, siendo los primeros (2 o 3) asociados con el solicitante o desarrollador de la tecnología, los siguientes caracteres (5 y 6) están relacionados con el evento de transformación y el ultimo está asociado con la verificación de dicho evento (Dong *et. al.*, 2008). El ordenamiento de los eventos de transformación en códigos “IdU” permite a cualquier ciudadano común o a los tomadores de decisión, la

búsqueda e identificación y verificación de la mercadería que está llegando en un momento determinado a un puesto aduanal.

En resumen, esta estrategia permite la búsqueda rápida, fácil sobre un OVM, garantiza que las importaciones y exportaciones de OVM tengan las aprobaciones necesarias, permite revisar el estado mundial de otras decisiones relacionadas con el OVM, permite detectar importaciones ilícitas o involuntarias, y por tanto se pueden adoptar las medidas necesarias y tomar en tiempo real las decisiones técnicas, políticas y económicas oportunas en cuanto al OVM objeto de búsqueda, además de alumbrar los pasos siguientes los cuales están básicamente relacionados con el tipo de estrategia de detección e identificación que se deben emplear para corroborar de manera efectiva la identificación y/o cuantificación del OVM.

2. Ensayos de evaluación directa

Cuando se sospecha que una mercadería agrícola es producto del desarrollo de la IG, y no se cuentan con materiales y equipos que permitan la detección molecular del mismo, se hace uso de esta estrategia de detección e identificación, la cual se basa en someter el material MG a la presión de selección para lo cual fue diseñado (Conceição *et. al.*, 2006; Longo y Galindo, 2006).

Torres *et. al.* (2003), desarrollaron un método de evaluación directo, simple, económico y efectivo para comprobar la tolerancia de semillas de soya al herbicida glifosato. El sistema de detección consistió en usar papel de filtro humedecido con una solución de 100 a 200 uM del herbicida glifosato como sustrato para la germinación de las semillas de soya. Las semillas de soya tolerantes al glifosato germinaron normalmente en esas soluciones, entre 7 y 10 días después de sembradas, desarrollando un sistema radical típico y por tanto una plántula normal. En contraste, en las semillas de soya no transgénica se paralizó el crecimiento de la raíz primaria, y posteriormente las mismas murieron.

3. Métodos basados en proteínas

La detección específica de las proteínas producto de la introducción de nuevos genes en organismos transgénicos constituye una alternativa válida cuando se emplean anticuerpos desarrollados específicamente contra esas proteínas. Sin embargo, es necesario aclarar que la modificación genética no siempre está dirigida a la producción de nuevas proteínas o quizás la expresión de la nueva proteína es tan baja que simplemente no puede ser detectada (Longo y Galindo, 2006).

En general, se señala que este tipo análisis tiene utilidad práctica cuando se aplica sobre tejidos vegetales en los cuales se expresa la proteína transgénica. Es un método sencillo, que normalmente puede ser ejecutado por cualquier persona y en cualquier lugar; la desventaja que presenta es la imposibilidad de aplicarse en matrices muy procesadas, debido a la desnaturalización de la proteína transgénica, también se dificulta la posibilidad de identificar entre distintos cultivos MG que presenten la misma proteína transgénica. En cuanto a la cuantificación, se indica que existen muchos errores asociados con los niveles de expresión de la proteína transgénica, la fenología del cultivos y las condiciones ambientales en la cuales se desarrolló la planta (Conceição *et. al.*, 2006; Longo y Galindo, 2006). Existen tres formatos básicos de aplicación de los métodos basados en la detección de la proteína transgénica, los cuales son descritos a continuación.

Formato I: Placas recubiertas de anticuerpos

Este ensayo se fundamenta en la técnica inmuno absorbente ligada a una enzima, ELISA por sus siglas en inglés, y está catalogado como un método sensible, específico, seguro, robusto, rápido de aplicar, de bajo costo y que normalmente requiere de poco entrenamiento (Stave, 1999; Stave, 2002; Van Duijn *et. al.*, 2002), por lo que puede considerarse como un ensayo ideal de realizarse rutinariamente en los laboratorios. Por medio del mismo se detecta la proteína de interés en una muestra que puede contener numerosas proteínas distintas. Este tipo de ensayos también requiere que la proteína blanco se encuentre intacta en la muestra, y en la cantidad necesaria para ser detectada o identificada. Por ello, su utilización se limita a tejido fresco, o con muy bajo nivel de procesamiento (Longo y Galindo, 2006).

Mayormente se emplea el ELISA sándwich, el cual se fundamenta en la utilización de un anticuerpo fijado a un soporte que se une de forma específica a la proteína diana. Un segundo anticuerpo, se conjuga a dicha proteína y se genera un cambio de color visible fácilmente, el cual es medible y fácilmente cuantificable (Stave, 2002).

Formato II: Western Blot

Este es un método semi-cuantitativo altamente específico, particularmente empleado para el análisis de proteínas insolubles (Brett *et al.*, 1999). Por ser un método más laborioso, es poco empleado en los ensayos de detección de OVM (Conceição *et. al.*, 2006), por lo que más bien es empleado en la comprobación de la modificación genética durante del desarrollo del transgénico (Longo y Galindo, 2006). Las proteínas de las muestras a evaluar son extraídas y solubilizadas con detergentes y agentes reductores, posteriormente son separadas por electroforesis; estas proteínas separadas son transferidas a una membrana para exponerlas a un anticuerpo específico. Este anticuerpo es revelado empleando otro anticuerpo, el cual debe estar acoplado a un sistema de detección enzimática (Stave, 2002; ISO 21572: 2004).

Formato III: Tiras de flujo lateral

Las tiras de flujo lateral, son una metodología similar a la anterior, solo que las mismas pueden ser fácilmente transportadas de un lugar a otro sin tener que depender de materiales y equipos de laboratorio sofisticados. Esta metodología se asemeja a un test de embarazo en humanas, y se aplican como una estrategia previa para conocer de forma cualitativa la existencia o no de marcadores OVM (Stave, 1999; Stave, 2002).

Este método se aplica al analito de estudio, procesándolo de la manera como lo indica el “kit” y agregando la cantidad de búfer o agua adecuada para preparar una solución en la cual se obtenga la proteína. Posteriormente, se introduce en ella la tira de flujo lateral. Se espera a que fluya el líquido por la tira, hasta observar que la banda control se colorea, luego se extrae de la mezcla, se secan con papel secante y se comparan con el patrón de referencia que posee el “kit”. La aparición de una banda (control), indica que la prueba se desarrolló de manera adecuada, que las tiras funcionaron bien (no están vencidas) y que el cultivo puede considerarse negativo para el evento objeto de estudio (Figura 1a), mientras que la aparición de bandas adicionales indica un resultado positivo (Figura 1b) (Stave, 1999; Stave, 2002).

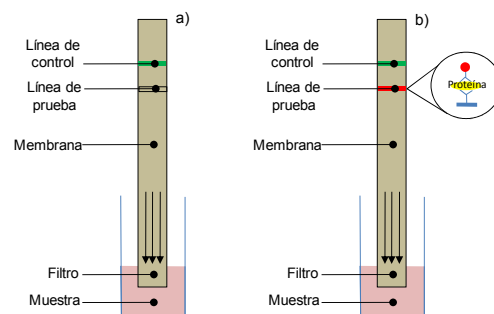


Figura 1. Ilustración de una ELISA tipo sándwich en una tira de flujo lateral. (Stave, 2002, con modificación del autor).

4. Métodos basados en ADN

Las estrategias de detección y cuantificación de OVM basadas en ADN son consideradas las más globalizadas en su uso en todo el globo terráqueo, ya que las mismas se basan en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Gachon et al., 2004; Nesvold et al., 2005; Cankar et al., 2006). Por ello, es considerado un método capaz de detectar una amplia gama de eventos, con excelentes niveles de especificidad, sensibilidad y seguridad. Adicionalmente, con su aplicación es posible distinguir entre las plantas modificadas genéticamente que tienen diferentes construcciones genéticas, pero que expresan proteínas iguales, o cuando una planta MG proviene del diseño de la estrategia del gen anti-sentido (Conceição et al., 2006). La principal limitación que presenta es la dificultad para la construcción de los cebadores o primers, la inexistencia de materiales de referencia certificados y costos elevados, ya que cada prueba debe ser específica a una modificación genética particular (Nesvold et al., 2005; Cankar et al., 2006).

Son ampliamente recomendados de usar dado que los resultados pueden obtenerse con el mismo método sobre idénticos elementos de análisis en laboratorios distintos con diferentes analistas que emplean distintos equipos; también los mismos permiten obtener resultados analíticos independientes con el mismo método sobre idénticos métodos de análisis en el mismo laboratorio por el mismo analista que emplea el mismo equipo en intervalos de tiempo distintos (ISO 21570: 2005). Estas características permiten incluir estos ensayos en estudios colaborativos para la validación de los métodos de detección y cuantificación de OVM (Cantrill, 2008).

La PCR incluye tres modalidades ampliamente utilizadas para la detección de OVM, ellas corresponden a la PCR convencional (o también denominada tiempo final), la PCR competitiva y la PCR tiempo real (o RT-PCR). La diferencia entre ellas radica en la forma en que se reporta la detección del producto de amplificación, los tipos de resultados obtenidos, el tiempo de ejecución y los costos de aplicación de las pruebas.

Según Tengeli et al., 2001; Cazzola y Petrucci, 2006; Conceição et al., (2006) y Longo y Galindo (2006), gran parte de las pruebas de detección de OVM se apoyan en las técnicas basadas en PCR tiempo convencional. Esta, es considerada la metodología por excelencia para la verificación de la presencia o no de secuencias asociadas a construcciones transgénicas. Para evaluar los posibles fragmentos de ADN amplificados se recurre a la electroforesis en geles de agarosa, lo que permite la separación y posterior identificación de los fragmentos de ADN. Finalmente, para la visualización de los distintos fragmentos se utiliza Bromuro de Etidio o Sybr Green, las cuales son moléculas

fluorescentes que se intercalan en el ADN, facilitando la visualización de éstas en presencia de luz ultravioleta.

Con la PCR tiempo convencional, se evalúa la presencia o ausencia de bandas de un determinado peso molecular que corresponda con el segmento amplificado. La presencia en el gel de una banda con el peso molecular esperado, indica un resultado detectado. Los resultados de esta prueba son de tipo cualitativo ya que se informa al interesado de la presencia o ausencia de una banda de peso molecular conocido.

Por su parte, la PCR competitiva consiste en la amplificación simultánea de dos secuencias de ADN que compiten por los reactivos de la reacción. Una de las secuencias corresponde a la secuencia GM que se quiere detectar, mientras que la otra corresponde con la secuencia de un ADN competidor en la que se emplea la misma secuencia blanco a detectar pero de menor tamaño a la secuencia MG. Esto supone que la eficiencia de la amplificación es similar para ambos productos (James *et al.*, 2003).

James *et al.* (2003), Conceição *et al.*, (2006) y Longo y Galindo (2006), indican que actualmente los competidores provienen de ADN plasmídico por lo que la reproducibilidad es mayor y por tanto la eficiencia también lo es. Adicionalmente, es importante lograr el correcto diseño del ADN competidor, pues sino no se logra la eficiente similitud de amplificación entre el blanco GM y el ADN competidor, no se logrará la correcta equivalencia entre la secuencia blanco (GM) y el competidor.

Para su aplicación, se realizan varias PCR con distintas concentraciones conocidas del ADN competidor, hasta lograr una situación de equivalencia donde la intensidad de la señal obtenida mediante la electroforesis en geles de agarosa sea la misma para la secuencia blanco GM y el competidor. En este punto, se realiza la cuantificación, aunque es poco utilizado para tales fines.

Por su parte, la PCR tiempo real (RT-PCR), difiere de las técnicas antes descritas, ya que la misma permite cuantificar de una manera sensible, rápida y específica el gen de interés; adicionalmente, es posible registrar los resultados de una manera directa "*in silico*", a medida que van transcurriendo los ciclos de amplificación en el termociclador (Gachon *et al.*, 2004; Cankar *et al.*, 2006).

La reacción de amplificación se desarrolla bajo la acción de un fluorocromo excitado por un láser, el cual emite una señal. Esta señal, es proporcional a la cantidad de ADN que se genera en cada paso de la reacción. La señal es emitida al lector de fluorescencia y este cuantifica la señal emitida. El computador procesa la información y presenta, en cada ciclo, la fluorescencia emitida (o cantidad de producto de PCR amplificado), en cada muestra (Gachon *et al.*, 2004; Longo y Galindo, 2006) (Figura 1).

En relación con la cuantificación, la misma puede realizarse de dos maneras: la primera, mediante la relación del gen o segmento transgénico con respecto al total de ADN presente en la muestra. Para ello, se realizan dos PCR, una para identificar y cuantificar la secuencia MG y la otra para la cuantificación del ADN total de la muestra (Gachon *et al.*, 2004; Gasparic *et al.*, 2008).

La otra opción de cuantificación, está relacionada con la elaboración de una curva estándar con el mismo tipo de muestra que las sometidas a estudio (muestras problema). Para esta categoría, es necesaria la correcta cuantificación del ADN, tanto en las

muestras problema como en los estándares de la curva, pues diferencias entre estas concentraciones conllevaría a errores en este proceso (Conceição *et al.*, 2006; Longo y Galindo, 2006). Esta opción, tiene como desventaja que no es aplicable en alimentos, sino solo en matrices sencillas como granos y semillas, siempre y cuando se conozcan los estados de cigosis, ploidía, número de inserciones del gen en el genoma o cuando se analicen eventos de transformación apilados (Longo y Galindo, 2006).

La RT-qPCR se ha convertido en la categoría más empleada para la detección y cuantificación de OVM. Sin embargo, esta metodología, posee ciertas limitaciones, las cuales están relacionadas con los costos para la adquisición del equipo y los reactivos, y el diseño de los cebadores es más exigente que los empleados en la PCR tiempo final (Conceição, Nunes y Binsfeld, 2006; Longo y Galindo, 2006; Gasparic *et al.*, 2008).

Según Conceição *et al.*, (2006), Longo y Galindo (2006) y Gasparic *et al.*, (2008), la reacción en cadena de la polimerasa, en cualquiera de las modalidades antes indicadas, permite diferenciar cuatro estrategias o categorías, según el diseño de los blancos de detección (o primer's), lo cual determina los diferentes niveles de especificidad de la estrategia a aplicar (Figura 2).

Longo y Galindo (2006), reseñan las cuatro estrategias antes citadas, siendo estas explicadas con mayor detalle a continuación.

Método de screening primario

Corresponde a la categoría menos específica dentro de las estrategias de detección. Para su aplicación, es necesario diseñar cebadores que reconozcan secuencias de ADN comunes a varios cultivos modificados genéticamente, por ello es considerado un método universal (Figura 2).

Normalmente, son amplificadas en la reacción de PCR, las secuencias promotoras, terminadoras y/o los genes indicadores (marcadores) de la transformación. Los de mayor uso son el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o del terminador NOS (Nopaline Synthase Terminator) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Su utilización como método de detección tiene algunos problemas en la práctica, ya que no permite la diferenciación de eventos que contengan iguales señales reguladoras. Adicionalmente, es importante indicar que algunas especies vegetales, especialmente las del género *Brassica*, son afectadas por el CaMV, lo cual conlleva a la prueba a arrojar falsos positivos.

En relación con la cuantificación, en la mayoría de los casos no es posible, ya que algunas secuencias reguladoras se presentan diferencialmente en distintos OVM, lo cual dificulta notablemente este procedimiento.

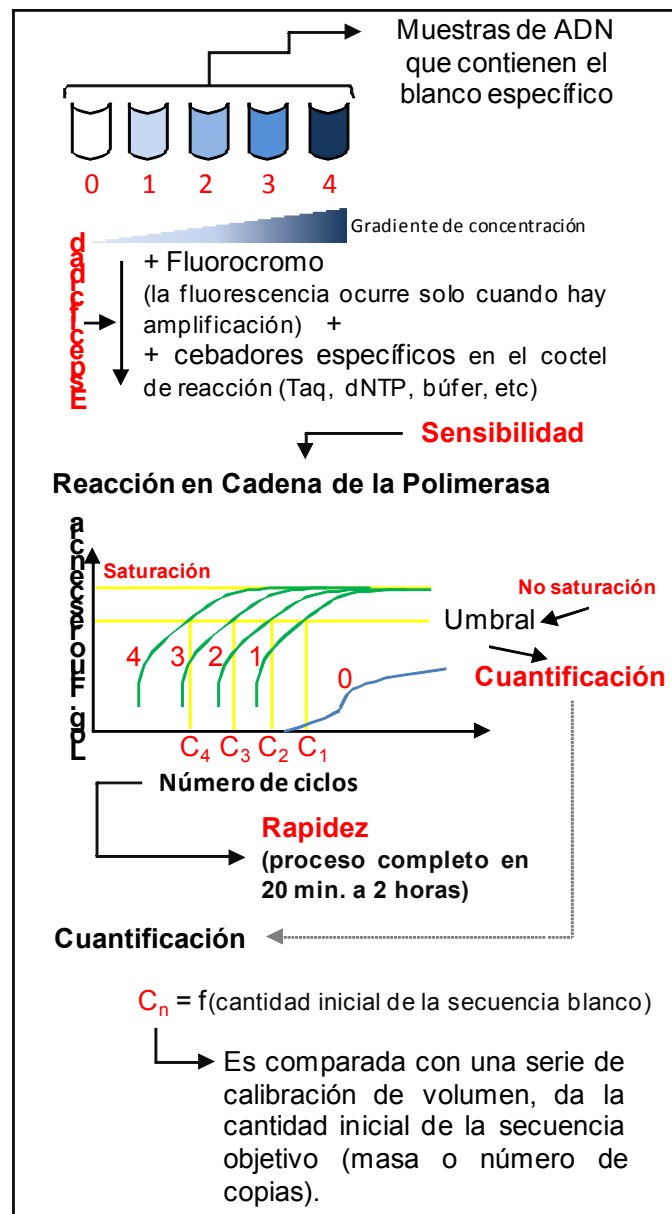


Figura 1. Representación esquemática de una serie de calibración de cantidades de la estrategia de detección por RT-PCR (Fuente: Gachon *et. al.*, 2004).

Método del Gen Específico

Mediante la aplicación de esta categoría, se diseñan primers que tienen la capacidad de detectar una sección de ADN que corresponde con la secuencia introducida en la planta y que es la responsable del fenotipo que muestra el OVM (Figura 2). Este tipo de detección no permite la diferenciación entre eventos distintos que contengan la misma secuencia, por ejemplo el gen que codifica para la proteína Cry1Ab, aunque se encuentren bajo diferentes elementos reguladores.

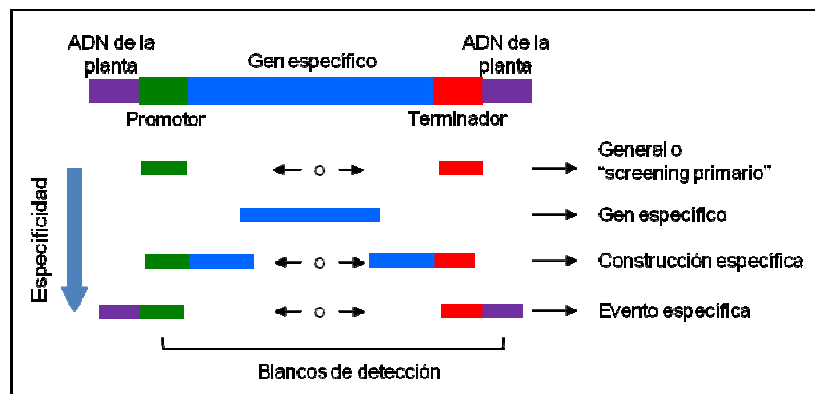


Figura 2. Representación esquemática de las estrategias o categorías de detección de OMG, de acuerdo con la inserción del blanco de detección (Fuente: Longo y Galindo, 2006).

Método para la detección de la construcción específica

Este método permite que los cebadores reconozcan parte de la construcción genética particular (gen específico) y parte de la secuencia terminadora, de los elementos genéticos que conforman la construcción (Figura 2).

Método para la detección del evento específico

Esta estrategia, permite la identificación exacta del evento de transformación. Para tal fin, los cebadores se diseñan para que anclen en la región genómica de la planta próxima a la construcción introducida, e incluso sobre la construcción misma, de tal manera que sólo se podrá detectar esa inserción en particular (Figura 2).

5. Otros métodos de detección de OVM

Nuevos métodos de detección de OVM se están ensayando en la actualidad con resultados muy promisorios, entre ellos se puede mencionar las micromatrices de ADN (Holst-Jensen, 2003). Estas micromatrices están siendo ampliamente utilizadas para análisis masivos de expresión, detección de polimorfismos y para genotipaje (Nesvold *et al.*, 2005).

Esta tecnología apunta hacia la automatización de procesos de detección masiva en formatos de muy pequeña escala, tipo chip de ADN, en las cuales múltiples moléculas de ADN de cadena simple están ordenadas matricialmente en la superficie de un portaobjetos. Con base en el principio de la hibridación molecular y utilizando compuestos fluorescentes, un lector láser permite evaluar instantáneamente decenas de miles de secuencias transgénicas en un solo experimento, la cual es su mayor ventaja a la hora de estudiar eventos transgénicos muy complejos como los de tercera generación (Nesvold *et al.*, 2005). Las desventajas de su uso son los elevados costos para la adquisición de los equipos, la complejidad sobre los criterios estadísticos para la interpretación de los datos y la imposibilidad de obtener resultados cuantitativos, sensibles y reproducibles para los niveles exigidos en la actualidad para la detección de OVM (Longo y Galindo, 2006).

6. Normas de calidad internacional y sus definiciones

La Organización Internacional de Normalización (ISO), ha desarrollado varias normas para establecer estándares de calidad en materia de detección de secuencias derivadas de OVM. El uso de éstas, facilitará el desarrollo de metodologías desde el punto de vista

legal y científico, así como la cooperación entre laboratorios mediante el correcto intercambio de información entre los diversos organismos interesados en las experiencias de aplicación, evaluación, validación y armonización de los métodos y procedimientos para la detección de OVM, en el ámbito geográfico requerido (Cantrill, 2008).

La ISO, ha desarrollado tres normas específicas relacionadas con la detección y cuantificación de OVM. La primera de ellas es la norma ISO 21569:2005 relacionada con la detección cualitativa de OVM, derivados y productos que los contenga; la norma ISO 21570:2005 relacionada con la aplicación de métodos cuantitativos de detección de ácidos nucleicos y la ISO 21571:2005 que detalla los métodos de extracción de ADN para la realización de las pruebas de detección y cuantificación de OVM, derivados y productos que los contengan. Adicionalmente, la ISO desarrolló la norma 21572:2005 en la cual se detallan los procedimientos para la detección de OVM, derivados y productos que los contengan, mediante la aplicación de los métodos basados en los inmunoensayos (Cantrill, 2008; Comité de Codex Alimentarius, 2008).

Es también importante mencionar a la norma ISO 17025:2005, en la cual se establecen los requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración (FONDONORMA – ISO / IEC 17025: 2005). En la citada norma, se indican los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos, desde los métodos de calibración, hasta el muestreo, legislando incluso sobre métodos no normalizados y los desarrollados por el propio laboratorio.

En concordancia con la aplicación de las normas citadas anteriormente se considera importante aclarar que existen diferentes términos y/o definiciones asociados con la detección y cuantificación de un OVM. Dichos términos se clasifican en generales, de control y validación del método de detección y cuantificación del OVM. A continuación se hará una descripción de tales términos, según lo indicado en las normas internacionales relacionados con la materia. Se hace la aclaratoria de que no serán descritos los términos relativos a la aplicación del método de detección y términos relativos a la técnica, dado que los mismos ya fueron detallados con anterioridad.

Término generales

Muestra: una o más unidades de muestreo tomadas de una población y destinada a aportar información sobre la población (ISO 21572: 2004).

Muestra de laboratorio: porción de la muestra que es destinada a un control o ensayo de laboratorio (ISO 21572: 2004).

Muestra de análisis: preparación y adecuación de la muestra de laboratorio para ser sometida al análisis objeto de estudio (ISO 21572: 2004).

Términos relativos al control:

Control de reacción de PCR: Para comprobar la viabilidad del uso de los reactivos de PCR se incluye una muestra de análisis en la cual el templado de ADN es sustituido por

agua. Con ello también se descartan falsos positivos o contaminantes en el resto de las muestras de análisis.

Control negativo de reacción: Es una muestra de análisis que no contiene la secuencia ADN de interés.

Control positivo de reacción: Es una muestra de análisis que contiene la secuencia ADN de interés.

Material de referencia: material o sustancia en la que una o más de sus propiedades presentan valores suficientemente homogéneos y bien establecidos como para ser empleados en la calibración de un equipo, la evaluación de un método de medida o para asignar valores a materiales (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed. European Commission).

Términos relativos a la validación:

Exactitud: es la proximidad entre un resultado analítico y el valor de referencia aceptado. Cuando se aplica a un conjunto de resultados analíticos implica una combinación de componentes aleatorios y un error sistemático o desviación (ISO 21570: 2005).

Precisión: es la proximidad entre resultados independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión depende solamente de la distribución aleatoria de errores y no está relacionada con el valor verdadero o el valor especificado.

Límite de detección: para los métodos cualitativos es la menor concentración o contenido del analito que puede ser detectado de forma fiable, pero no necesariamente cuantificado, demostrado mediante ensayo colaborativo satisfactorio o por una validación de un único laboratorio individual (Documento CX/MAS 08/29/8 del Comité del Codex Alimentarius sobre métodos de análisis y muestreo de OVM, 2008).

Límite de cuantificación: para un procedimiento analítico es la menor cantidad o concentración de analito presente en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con un nivel de precisión y exactitud aceptable demostrada mediante ensayo colaborativo satisfactorio o una validación de un único laboratorio individual (ISO 21572: 2005).

Falso negativo: se entiende por falso negativo aquel resultado que no manifiesta el analito esperado cuando en realidad si está presente en la muestra en niveles superiores al límite de detección (Longo y Galindo, 2006).

Falso positivo: es aquel resultado que se informa como positivo cuando en realidad en la muestra no se encuentra el analito a detectar o está muy por debajo del nivel reportado (Longo y Galindo, 2006).

Consideraciones finales

La identificación "*in silico*" de un OVM permite de una forma rápida, y con tan solo empleando un computador con acceso a internet, conocer el estado actual mundial del comercio e intercambio transfronterizo de transgénicos.

Los métodos de detección y cuantificación basados en proteínas normalmente son aplicados en campo o en aduanas, por su facilidad de aplicación, rapidez para la obtención de resultados, ser de bajo costo y operables por cualquier persona; sin embargo, los mismos no son aplicables a matrices muy procesadas y, en el caso de

matrices poco procesadas tanto la detección como la cuantificación están muy influenciadas por factores externos.

Debido a la alta sensibilidad la PCR es la metodología por excelencia para detectar y cuantificar el contenido de secuencias transgénicas en productos y derivados de OVM.

A pesar de que mediante el uso de los microchips de ADN son una buena alternativa para analizar muchos blancos de detección simultáneamente y en poco tiempo, siguen teniendo como desventaja los elevados costos de aplicar los mismos en el campo comercial.

Los métodos de detección y cuantificación constantemente deben ser revisados para mejorar las características de precisión, rapidez y costos, entre otros.

Finalmente, para que un método de detección y cuantificación sea aceptado para su uso en gran escala, el mismo debe pasar por una serie de pasos, siendo uno de los mas importante la creación de redes de laboratorios para el diseño de ensayos colaborativos en interlaboratorios en donde se validen y armonicen los criterios y nuevos formatos de detección y cuantificación de OVM.

Bibliografía consultada

1. **Brett et al.**, 1999. Design and development of immunoassays for detection of proteins. Food control. p. 401-406.
2. **Cankar, K., D. Stebih, T. Drejo, J. Zel y K. Gruden.** 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/37>.
3. **Cantrill, R.** 2008. International development of method of analysis for the presence of product of modern biotechnology. Asia Pacific Journal to Clinic Nutrition. 17 (S1): 233 – 236.
4. **Cazzola, M. y S. Petruccelli.** 2006. Semiquantitative analysis of genetically modified maize and soybean in food. Electronic Journal of Biotechnology. 9 (3).
5. **Conceição, F., A. Nunes y P. Binsfeld.** 2006. Detecção e quantificação de organismos genéticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. Ciência Rural. 36 (1).
6. **Codex Alimentarius Commission.** 2008. Resúmenes de las reuniones sobre los métodos para la detección e identificación de alimentos derivados de la biotecnología. Documento CX/MAS 08/29/8. Budapest, Hungría.
7. **Dong, W., L., Yang, K. Shen, B. Kim, G. Kleter, H. Marvin, R. Guo, W. Liang y D. Zhang.** 2008. GMDD: a database of GMO detection methods. BMC Bioinformatic. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/260>.
8. **Gachon, C., A. Mingam y B. Charrier.** 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. Journal of Experimental Botany.
9. **Gasparic, M., K. Cankar, J. Zel y K. Grudel.** 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. BMC Bioinformatics. Disponible en: www.biomedcentral.com/1472-6750/8/20.
10. **Holst-Jensen, A.** 2003. Advanced DNA-based detection techniques for genetically modified food. In: Lee M (ed): Food authenticity and traceability. Woodhead publishing, Cambridge. p. 575-594.
11. <http://www.bch.cbd.int>.
12. <http://www.cera-gmc.org>
13. <http://www.gmdd.shgmo.org>.
14. **International Life Science Institute.** 2007. Métodos de muestreo para la detección de organismos modificados genéticamente.
15. **FONDONORMA-ISO/IEC 17.025: 2005.** Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Fondo para la Normalización y Certificación de la Calidad.
16. **ISO 21569: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos.
17. **ISO 21570: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos.
18. **ISO 21571: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos.

19. **ISO 21572: 2004.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos basados en proteínas.
20. **James, D., A. Smchmidt, E. Wall, M. Green y S. Masri.** 2003. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5829 – 5834.
21. **Longo, F. e I. Galindo.** 2006. Métodos de detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en la cadena agroalimentaria: conceptos para su aplicación. Publicaciones del Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe y de la Red Regional de Bioseguridad. 63 p.
22. **Nesvold, H., A. Brathen, A. Holst y K. Berdal.** 2005. Design of a DNA chip for unknown genetically modified organisms (GMOs). *Bioinformatics Review*. 21 (9): 1917 – 1926.
23. **Stave, J.** 1999. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO - future needs. *Food Control*. 10: 367-374.
24. **Stave, J.** 2002. Protein Immunoassay Methods for Detection of Biotech Crops: Applications, Limitations, and Practical Considerations. *J. of AOAC International*. 85 (3): 780-786.
25. **Van Duijn G., R. van Biert, H. Bleeker-Marcelis, I. Van Boeijen, A. Jama, S. Jhakrie, y M. Hensing.** 2002. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods by Protein- and DNA-Based Techniques: Bridging the Methods. *J. of AOAC International*. 85 (3): pp. 787-791.
26. **Tengel, C., P. Schubler, E. Setze, J. Balles y M. Sprenger.** 2001. PCR- Based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Biotechniques*. 31 (2): 426 – 429.
27. **Torres, A., W. Nascimento, S. Vasconcelos y F. Souza.** 2003. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. *J. Pesq. agropec. bras.* 38 (9): 1053-1057.

Capítulo IV

Detección e identificación de secuencias asociadas a Organismos Vivos Modificados en semillas de maíz (*Zea mays* L.) empleando los métodos de inmunoensayos y análisis por PCR en tiempo final y real

Resumen

Con el fin de evaluar el estado de uso de las nuevas tecnologías para la producción de alimentos en el país, se procedió a estudiar secuencias asociadas a OVM en semillas de maíz, dado que las mismas son susceptibles de introducirse deliberadamente en el ambiente. Para ello, se realizó un muestreo del 70% de las semillas de los cultivares de maíz sembrados en 2011, constituido por cinco (10) cultivares comerciales y dos (02) cultivares empleados por pequeños agricultores del país. A las muestras, se les realizó la extracción del ADN para detectar el gen de la invertasa (gen endógeno), después se aplicó la estrategia de detección “screening general primario” empleando secuencias de “primer’s” que anclaran en la región común a varias secuencias transgénicas (Promotor 35S, Terminador NOS, Pat y Bar). De dicha evaluación, se obtuvo que una de las muestras fuese detectada para P35S, Tnos y Pat, motivo por el cual se procedió a realizar un ensayo de laboratorio para identificar el evento específico DAS-Ø15Ø7-1, corroborándose en tales ensayos que dicha semilla es un cultivar resistente a herbicidas y tolerancia a insectos lepidópteros. Se tiene así el primer reporte en Venezuela del uso de semillas de OVM en el cultivo de maíz, con el agravante de que los mismos no están autorizados en el país, por lo que tal actividad está catalogada como ilícita. Por tal motivo, se sugiere aumentar los controles aduanales para evitar la entrada de este tipo de materiales o sincerar la situación nacional en bioseguridad, mediante el desarrollo de las leyes específicas en la materia, con el fin de evitar tales ambigüedades entre las opiniones del Estado y la posición de los productores agropecuarios.

Palabras claves: detección, organismos vivos modificados, semillas, maíz.

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.), se originó en una parte restringida de México (McClintock *et al.*, 1981), y los tipos más desarrollados emigraron hacia otros sitios de América (Bejarano y Segovia, 2000). Dentro de todas las plantas cultivadas, el maíz es el único que presenta un elevado nivel de domesticación (Paterniani, 2000). Ello quiere decir que es una especie totalmente dependiente del humano, pues los procesos de selección y mejoramiento genético eliminaron por completo las características ancestrales de sobrevivencia en la naturaleza (Paterniani, 2000).

El maíz es un alimento básico para muchas poblaciones en el mundo, especialmente en México, América Central, Venezuela y Colombia (Cartay, 2000). En nuestro país, esta especie es empleada mayormente para la obtención de la harina precocida, de la cual se elaboran las “arepas”, consideradas como un plato típico nacional. Por ello, la producción de este rubro en Venezuela debería suplir al menos la necesidad básica nacional establecida por la demanda de la población. Como es bien sabido, todo sistema de producción agrícola debe contar con el adecuado suministro de la semilla, pues de ella depende una buena producción (Oropeza *et al.*, 2000). A pesar de que para el año 1988, el país se suplía de la semilla que iba a emplearse en sus campos de producción, a partir de esa fecha se inició un proceso de desequilibrio en el abastecimiento de este insumo,

que trajo como consecuencia, más recientemente de 2005 a la fecha, la importación de semilla híbrida de maíz para cultivarse en campos venezolanos.

Como se sabe, el conocimiento en diferentes áreas y campos, no solo de la agronomía, sino de otras áreas aplicadas a ella, han logrado desarrollar procesos y productos capaces de aumentar la eficiencia en la producción de alimentos. Es así como se indica que la Biotecnología Moderna, ha acelerado los procesos en el mejoramiento genético de especies vegetales, dado que mediante la inserción de genes entre especies evolutivamente distintas, se ha logrado desarrollar plantas que, mediante las técnicas de mejoramiento genético tradicionales, no hubiese sido posible de obtener. En maíz se han utilizado las técnicas de infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Ishida *et. al.*, 1996), bombardeo de partículas (Klein *et. al.*, 1989), corrientes eléctricas de bajo voltaje (Murry *et. al.*, 1989) y electroporación (Huang y Dennis, 1989), entre otras. Tales modificaciones siempre han estado centradas en la obtención de plantas con características que van desde la resistencia a herbicidas, plagas y enfermedades hasta aquellas relacionadas con mayor calidad nutricional o mejor calidad alimentaria (Lentini, 2000). El primer maíz transgénico fue desarrollado por Gordon-Kamm *et. al.* (1990), el cual era resistente a herbicidas. Posteriormente, se han ido agregando otros rasgos y características a este cultivo, y con ello ha aumentado la aceptación por parte de los productores agrícolas que siembran maíz.

Debido al “boom” de los OVM, la utilización de maíces transgénicos ha ido ascendiendo año tras año, hasta llegar a la cifra record de casi 35 millones de hectáreas en EEUU, en 2012 (James, 2013). Al igual que la adopción del maíz MG, la comercialización ha ido en ascenso año tras año (James, 2013). En este sentido es que la detección e identificación de los materiales susceptibles de ser OVM a comercializarse a nivel internacional, gana importancia, dado que de esta forma se autorizan, o no, iniciar con todas las tareas relativas al comercio de este rubro. Por ejemplo, dado que en Venezuela la posición nacional es rechazar el uso de OVM lo que se buscaría es la evaluación de los híbridos y cultivares susceptibles de ingresarse al país, evaluarlos en cuanto al estado genético (desde el punto de vista de transgénesis) y tomar la decisión de si un híbrido o no, ingresa al país en función de los resultados de dicho examen, negando la entrada a aquellos híbridos o cultivares que sean detectados como OVM. Vale destacar que esta tarea no se hace, quizás por una parte por falta de voluntad política, y por otra debido al poco personal capacitado que existe en el área.

Por las consideraciones expuestas anteriormente, se propone evaluar por primera vez en Venezuela, y empleando semillas comerciales de maíz, la detección de OVM susceptibles de ser introducidos en el ambiente, aplicando los métodos basados en proteínas y ADN, con el fin de saber hasta qué punto la posición política actual nacional en la materia se está cumpliendo en la práctica.

Materiales y Métodos

Selección y obtención de las semillas objeto de estudio

Para la selección de los nombres comerciales de maíz, se empleó la lista de cultivares elegibles del Servicio Nacional de Semillas (SENASA), Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras, para el período de siembra 2010-2011 en Venezuela, las cuales representaron al 70% de los cultivares sembrados en las zonas productoras de maíz (Cuadro 1). Como una forma de aplicación de la norma bioética venezolana no serán aclarados a personas

naturales o jurídicas, públicas o privadas los nombre de los cultivos comerciales que se evaluaron en esta investigación (Código de Ética para la Vida, 2003).

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

Categoría de clasificación en el laboratorio	Tipo	Color del grano	Origen	Año de Liberación
Control negativo	Variedad	Amarillo	Venezuela	1980
Control positivo	Híbrido	Amarillo	Argentina	1996
Muestra comercial 1	Variedad	Amarillo	Venezuela	2009
Muestra comercial 2	Variedad	Amarillo	Venezuela	2009
Muestra comercial 3	Variedad	Blanco	Venezuela	2005
Muestra comercial 4	Híbrido	Blanco	México	2003
Muestra comercial 5	Híbrido	Amarillo	Tailandia	2001
Muestra comercial 6	Híbrido	Blanco	México	2008
Muestra comercial 7	Híbrido	Blanco	México	2011
Muestra comercial 8	Híbrido	Amarillo	México	2005
Muestra comercial 9	Híbrido	Amarillo	EEUU	1999
Muestra comercial 10	Híbrido	Blanco	Venezuela	2005
Muestra comercial 11	Híbrido	Blanco	Venezuela	2005
Muestra comercial 12	Híbrido	Blanco	México	2006
Muestra Común 1	Variedad	Blanco	URF-INIA	n/a
Muestra Común 2	Variedad	Amarillo	URF-INIA	n/a

Las muestras del control negativo, así como los materiales comerciales 1, 2 y 3 se obtuvieron de la Unidad de Producción Socialista de Semillas- INIA, en Maracay. Las muestras comerciales de la 4 a la 9 y 12, fueron obtenidas en la empresa gubernamental Agropatria y las muestras 10 y 11 de la empresa Híbridos Mejorados Compañía Anónima (HIMECA). Las muestras categoría “común”, son semillas empleadas por pequeños productores, y fueron donadas por la Unidad de Recursos Fitogenéticos (URF) del INIA. Para el muestreo, se aplicó un procedimiento propuesto por la Asociación Internacional de Pruebas en Semillas (ISTA, 2003). Para lo cual se procedió a la selección aleatoria de los sacos, los cuales se encontraban debidamente sellados y etiquetados con su respectiva identificación (ISTA, 2003; ISO 21568: 2006). 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 maíz muestreados, con el orificio hacia abajo, por una de las esquinas. Se trató en todos los casos de alcanzar la otra esquina del saco, en forma diagonal, y en dirección ascendente formando un ángulo aproximado de 30°. Posteriormente se giró lentamente hasta presentar los orificios hacia arriba y se golpeó suavemente para facilitar la entrada de las semillas. Finalmente se extrajo el calador, teniendo la precaución de evitar derramar la muestra. Cada vez que el calador era introducido, se trataba de extraer muestras de 500 a 600g por saco, con las cuales se armaron los pools de semillas de 3kg aproximadamente. Se empacaron en bolsas de papel con su debida identificación. Los orificios abiertos con el calador fueron sellados con ayuda de una etiqueta.

Preparación de las muestras de laboratorio

Las semillas muestreadas se trasladaron al Laboratorio de Detección y Cuantificación de Organismos Modificados Genéticamente (OMG), adscrito a la Dirección de Agricultura y Soberanía Alimentaria del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), en donde se inició la aplicación de los métodos de detección molecular de transgénicos. La confirmación de los eventos específicos de transformación transgénica, se realizó en el Laboratorio de Detección de OMG, ente adscrito al Centro de Investigaciones Veterinarias y Agronómicas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), República Argentina.

Para la molienda de las muestras se contó con un molinillo tradicional de café, el cual previamente se limpió con un paño humedecido con una solución de etanol al 70% (3 veces), y una vez con hipoclorito de sodio al 5%. Se esperaba a que se secara totalmente para utilizarse. Dicha limpieza se realizó entre muestras y al finalizar la molienda.

Se inició el procedimiento, moliendo por tandas en función de la capacidad del molinillo, el control negativo, para posteriormente moler las muestras problema. En cada tanda era colectado, en un vaso plástico descartable, el polvo que quedaba adherido a las paredes del equipo y con ayuda de una espátula esterilizada, se homogeneizaba la muestra y se almacenaba en un tubo de falcón de 50ml esterilizado. De ahí se separaron cinco (05) muestras de laboratorio, dos (02) sub-muestras de 5g de harina de maíz se colocaron en vasos plásticos descartables con el fin de realizar los inmunoensayos de evaluación directa, dos (02) fueron colocadas en dos viales, llenando los mismos hasta la marca de 100uL, con las cuales se realizaron las pruebas de detección de transgenes basadas en ADN; mientras que un vial totalmente lleno se constituyó en la muestra “stock” de laboratorio, siendo almacenado a temperatura ambiente en el laboratorio.

Aplicación de las tiras de flujo lateral

En esta prueba se aplicó las tiras de flujo lateral desarrolladas por la empresa “Strategic Diagnostic Inc.” de EEUU, con el fin de evaluar las siguientes proteínas transgénicas: Cry1Ab, Cry3Bb, y CP4 EPSPS, las cuales detectan en combo los rasgos asociados con resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida “Round up Ready”. Las muestras de análisis para esta metodología se obtuvieron agregando a las muestras de laboratorio 7ml de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente hasta obtener una mezcla. Se realizó una prueba adicional, la cual consistió en germinar 50 semillas de cada cultivar en bandejas de plástico con papel de filtro común, regadas diariamente con agua común de chorro, durante una semana. Luego de ello, fueron seleccionadas todas las plantas, eliminando los restos de papel, y se maceraron en morteros fríos hasta obtener el sumo de las plántulas.

En cada mezcla se introdujo una tira de flujo lateral, se esperó a que fluyera el líquido, por la tira hasta observar que la banda control se coloreara, luego se extrajeron de la mezcla, se secaron con papel secante y se compararon con el patrón de referencia que posee el “kit”. La aparición de una línea (control), indica que la prueba se desarrolló de manera adecuada, que las tiras funcionaron bien (no están vencidas) y que el cultivar puede considerarse negativo para los eventos antes mencionados, mientras que la aparición de una o dos bandas, adicionales a las del control, indica un resultado positivo (Lin, Chiang y Chih, 2001; Quirasco *et al.*, 2004).

Pruebas de Detección basadas en ADN

Todas las pruebas de detección basadas en ADN se realizaron por duplicado, empleando métodos no normalizados por la “International Organization for Standardization (ISO)” (ISO 21570: 2005). Las mismas, se realizaron en dos repeticiones con el fin de evaluar la repetitibilidad y reproducibilidad de los ensayos de laboratorio. En todas las pruebas de este tipo, se utilizó un control negativo del transgén, que se corresponde con un cultivar de maíz producido por mejoramiento genético tradicional en Venezuela, un control negativo de PCR (reemplazando el ADN molde por agua), un control negativo de la especie específica (ADN de soya) para el caso del gen endógeno de la invertasa, y un control positivo de transgénico el cual provino de un ADN extraído a partir de una harina

de maíz que poseía el Laboratorio del IDEA, donada por el Laboratorio de Detección de OMG del INTA.

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; James *et al.*, 2003). Una vez realizado el proceso de extracción, se comprobó la cantidad y calidad del ADN según descrito por Tengel *et al.* (2001), Chen Lin *et al.* (2001), Zambrano *et al.* (2002) y Quirasco *et al.* (2004) y Gryson, (2010).

Aplicación de la PCR tiempo final para la amplificación del gen endógeno de maíz, el “screening” general primario para el P35S y Tnos y PCR en tiempo real para detectar los genes Bar y Pat

Se aplicó una prueba de detección para amplificar por PCR tiempo final los fragmentos de ADN asociados con un gen de copia única de la invertasa de maíz, esto con el fin de evaluar la calidad del ADN extraído. Luego se estudió las secuencias de varios eventos de transformación transgénica, evaluando aquellas relacionadas con el P35S del virus del Mosaico de la Coliflor y del Tnos de *Agrobacterium tumefaciens*, por PCR en tiempo final (Cuadro 3). Las condiciones de reacción de la PCR y los programas del termociclador se variaron de acuerdo con el blanco de detección de interés. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2,5% (m/v), preparados con búfer TBE al 1%, pH 8,3, se observaron y fotografiaron en un sistema de fotodocumentación GelDoc (BioRad).

Cuadro 2. “Primers” empleados para evaluar las secuencias asociadas con el gen endógeno de maíz, el “screening” general primario para el P35S, Tnos, Bar y Pat.

Blanco	Primer	Secuencia 5' → 3'	TA (°C)	TPA (pb)	Referencia
Endógeno	lvr-1	CCGCTGTATCACAAAGGGCTGGTACC	60	226	Ehlers <i>et al.</i> (1997).
	lvr-2	GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC			
P35S	P35S-U	GCTCTACAAATGCCATCAGATAGT	58	195	Lipp <i>et al.</i> , (1999).
	P35S-L	GATAGTGGGATTGTG CGTCA			
Tnos	NOS-A	GAATCCTGTTGCCGGTCTTGCG	63	127	Thion <i>et al.</i> , (2002).
	NOS-D	GCGGGACTCTAATCATAAAAACCC			
Bar	barF2	GCACAGGGCTTCAAGAGCGTGTC	62	177	James <i>et al.</i> , (2003).
	barR2	GGGCGGTACCGGCAGGCTGAA			
Pat	patF2	GAAGGCTAGGAACGCTTACG	62	262	Permingeat <i>et al.</i> , (2002).
	patR2	GCCAAAACCAACATCATGC			

TA: Temperatura de alineamiento; TPA: Tamaño del Producto Amplificado.

Cuadro 3. Condiciones de reacción y programa de la PCR en tiempo final según el blanco de detección

	Blanco de detección		
Componente	Endógeno	P35S	TNOS
Búfer	1X		
MgCl	4mM		1.25mM
Primer's	0.2µM	0.5µM	
dNTP's	0.2µM		
Taq	0.625U		
DMSO	5%		
ADN	≈200ng		

Volumen final: 25µL.

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	95	3
Desnaturalización	95	0.75
Alineamiento	58 ^{lvr}	0.75
	60 ^{P35S}	
	63 ^{TNOS}	
Amplificación	72	0.5
Amplificación final	72	5

lvr: endógeno; P35S: promotor 35s;
TNOS: Terminador NOS.

La evaluación de las secuencias de los genes de la Fosfinotricina Acetiltransferasa aislados de *Streptomyces hygroscopicus* (Bar) y de *S. viridochromogenes* (Pat), se realizó

por PCR en tiempo real, en el INTA-Argentina. La secuencia de primer's es la que se indica en el Cuadro 2. Se usó el "kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I" de Roche Diagnostics. Las condiciones del programa de PCR fueron utilizadas por defecto como lo señala su manual de procedimiento en el "kit" antes mencionado. En esta metodología se informó como detectado aquellas muestras que presenten pico de Tm en el rango característico y que tenga un Ct < a (Ct del control +2) (Hernández *et. al.*, 2003; Corbisier *et. al.*, 2005).

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

Para identificar los eventos específicos de transformación T25, Bt-11 y TC1507, se procedió a realizar las respectivas PCR en tiempo real, según lo descrito anteriormente, sólo a aquellas muestras que dieron positivo para P35S, Tnos, Pat y/o Bar, utilizando las secuencias de "primer's" tal como se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 3. "Primers" empleados para evaluar las secuencias asociadas con los eventos de transformación transgénica T25, Bt-11 y TC1507.

Blanco	Primer	Secuencia 5' → 3'	TA (°C)	TPA (pb)	Referencia
T25	T25-1F	CAGCGACAATGGCGGAACGACTCAA	65	225	Xiang <i>et. al.</i> , (2009).
	T25-2R	CCTTTCCTTTATCGCAATGATGGCA			
Bt-11	Bt11-1	TATCATCGACTTCCATGACCA	63	207	Zimmermann, Lukthy y Pauli, 2000.
	Bt11-2	AGCCAGTTACCTTCGGAAAA			
TC1507	MaiY-F1	TAGTCTTCGGCCAGAATGG	60	58	CRL
	MaiY-R3	CTTGCCAAGATCAAGCG			

TA: Temperatura de alineamiento; TPA: Tamaño del Producto Amplificado; CRL: Community Reference Laboratory for GM Food and Feed. European Commission.

Resultados y Discusión

Tiras de flujo lateral

En la Figura 1, se observa que todas las bandas se tiñeron a nivel del control de detección, o sea que la prueba se aplicó de manera correcta y que las tiras no estaban vencidas; también puede observarse que cuando se aplican las tiras directamente sobre la harina de semillas de maíz, ninguno de los cultivares de maíz resultó ser positivo a los eventos de transformación que se estaban evaluando (Figura 1 a y b). En contraste, cuando se aplicó la prueba en semillas germinadas por una semana, se logró observar que el cultivar comercial 12 fue detectado para la característica resistencia a insectos lepidópteros, pues se tiñó la banda a nivel de la proteína Cry1Ab (Figura 1c). Este resultado "falso negativo" se debe en buena parte en que las semillas son sometidas a temperaturas que superan los 50°C, con el fin de disminuir la humedad de campo a la humedad apropiada de comercialización (Chen *et al.*, 1972; Association of Official Seed Analysis, 1985), por lo que en este tipo de analito la proteína transgénica es desnaturalizada, y no es reconocida en su sitio en la banda.

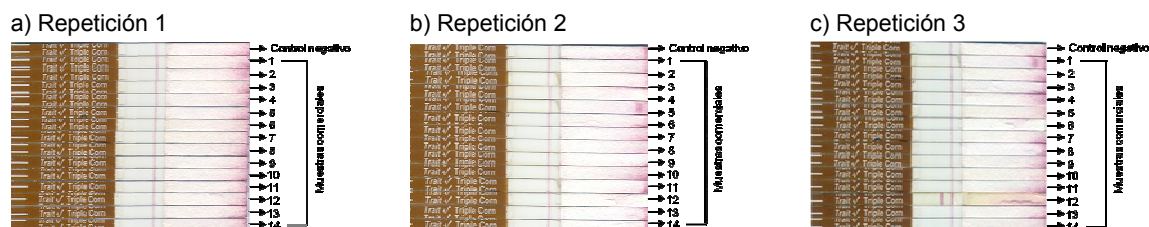


Figura 1. Resultados de la aplicación de las tiras de flujo lateral en muestras comerciales de maíz. a y b) en semillas; c) en plántulas

Los resultados permiten señalar que a pesar de que la prueba se recomienda de aplicar, en campo o en aduanas para la detección temprana de semillas y granos de OVM (Stave, 1999; Van Duijn *et al.*, 2002) por su facilidad de realización, rapidez en la obtención de resultados, reproducibilidad y repetitibilidad (Stave, 1999; Van Duijn *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 2000; Stave, 2002; Van Duijn *et al.*, 2002; Longo y Galindo, 2006), tiene como desventaja que sólo puede utilizarse en muestras con un mínimo, o ningún, procesamiento, pues es la única forma de garantizar que los resultados de la aplicación del método expresen los niveles de sensibilidad adecuados (López, Mayorquín y Vegas, 2003; Longo y Galindo, 2006; Rochedo, Nunes y Canisio, 2006).

Extracción de ADN de las muestras de soya

El método de extracción utilizado fue adecuado pues se desarrolló específicamente para extraer ADN en matrices poco procesadas, como harinas de semillas y granos, así como en productos alimenticios con bajo contenido de lípidos y que no han recibido intensos tratamientos térmicos (Cazzola y Petrucelli, 2006). De esta manera, debido al poco procesamiento de las muestras se recomienda utilizar el “kit” comercial desarrollado por Macherey Nagel, ya que así se estandarizan las condiciones entre laboratorios en cuanto a la extracción de ADN (Lipp *et al.*, 1999; Thion *et al.*, 2002; ISO 21571: 2005; Di Bernardo *et al.*, 2007) (Figura 2).

Evaluación del gen endógeno.

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

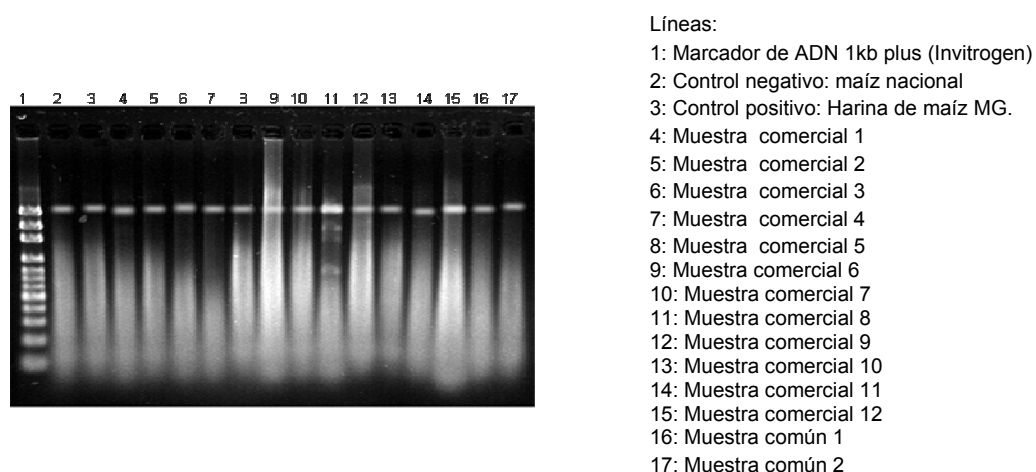


Figura 2. Análisis de la extracción de ADN de las muestras de soya objeto de estudio, en gel de agarosa al 1%.

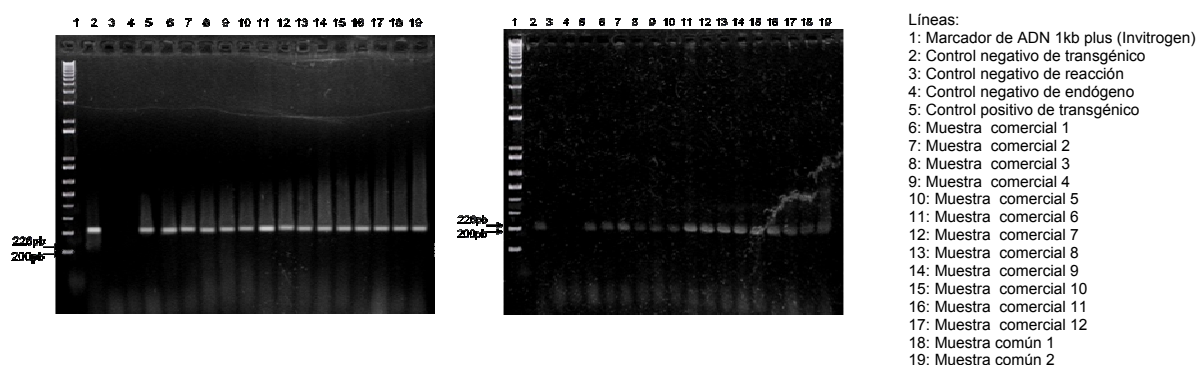


Figura 3. Amplificación del gen de la invertasa en muestras comerciales de semillas de maíz.

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). Entonces, se concluye que tanto la extracción de ADN, así como la PCR para evaluar la identidad del maíz, se realizó de forma correcta, ya que los resultados obtenidos de manera independientes son similares entre sí, lo cual le da el carácter de repetitibilidad al ensayo (ISO 24276: 2005). Resultados similares fueron reportados por Cazzola y Petrucelli (2006).

El método empleado en esta investigación fue validado en estudios colaborativos organizados por el grupo de trabajo de “Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética”, del “German Federal Institute for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine” (German Federal Foodstuff Act., 1998; Reporte N° XXIV/98/A3/001 de la Unión Europea). Para la extracción del ADN, se utilizó el método del CTAB, y como diana específica del taxón (gen endógeno), se empleó la secuencia descrita en la base de datos del GenBank bajo el número de acceso U16123 (Hernández *et al.*, 2005; Zhang y Guo, 2011). Como resultado obtuvieron que el método sólo amplifica el ADN asociado con el gen endógeno de la especie de interés, por tanto se puede asegurar que el mismo presenta una alta especificidad para ADN obtenido a partir de harina de maíz. Similares resultados señalan Broll *et al.*, (1998) y Meyer, (1999).

Aplicación de la estrategia “screening” general primario.

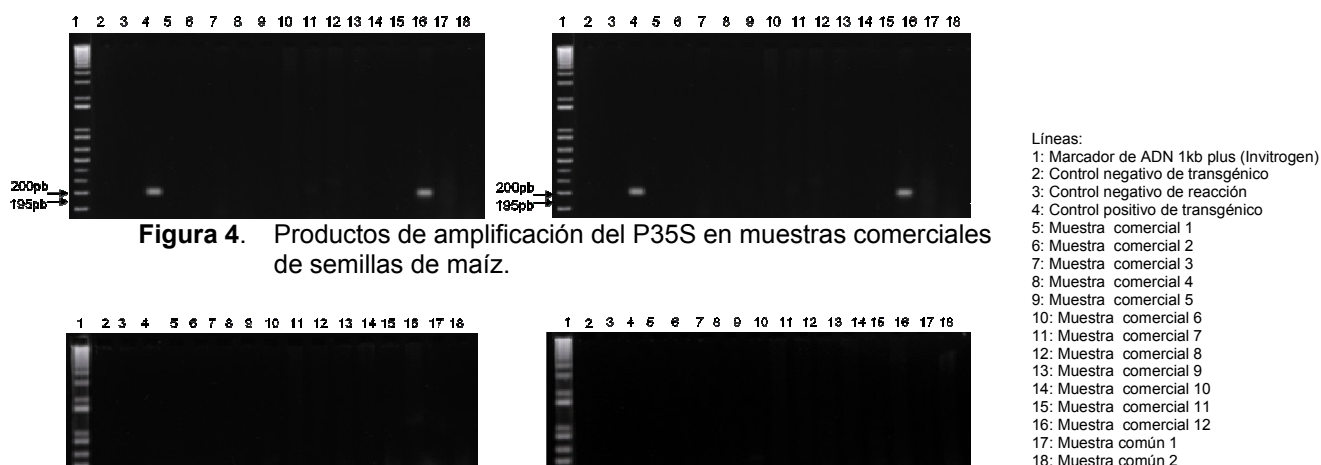
a) Evaluación de la presencia del Promotor 35S del Virus del Mosaico de la coliflor y del Terminador NOS de *A. tumefaciens*

Los resultados de la Figura 4 indican que la muestra comercial 12 presentó la banda de 195pb (Línea 16), la cual está asociada con la existencia del P35S, pudiendo encontrarse inserto desde una copia hasta un número variable de copias en el genoma de la planta de maíz (Hemmer, 1997; Pietsch *et al.*, 1997; Zhang y Guo, 2011). Por su parte, con respecto al terminador NOS de *A. tumefaciens* los resultados indican que la muestra comercial 12 contenía ADN amplificable de una fuente similar o igual al Tnos, pues al ser comparada esta con el producto de amplificación positivo de reacción se observa la gran similitud entre estas (Figura 5).

En la actualidad la mayoría de los cultivos transgénicos comercializados contienen las secuencias de estas señales de inicio y fin de la expresión del transgen, motivo por el cual es frecuentemente utilizado en ingeniería genética para lograr tal fin (Hemmer, 1997; Pietsch *et al.*, 1997). El P35S es común de encontrarse en los siguientes eventos de transformación de maíz: Bt-176, Bt-11, MON810, TC1507, DAS59122, T25, MON88017,

MON863 y NK603, siendo detectable a límites de 0,1% m/m en granos de maíz, empleando como materiales de referencia aquellos que han sido certificados por la “Joint Research Center” (ISO 21569: 2006). El Tnos, se puede hallar en los siguientes eventos: Bt11, TC1507, MON88017, MON863, NK603 y GA21 y es detectable a límites de 2%. Finalmente se resalta que sólo los eventos Bt 11, TC1507, MON88017, MON 863 y NK603 son quienes tienen en la misma construcción transgénica a ambos reguladores de la expresión del transgen, en maíz (Zhang y Guo, 2011).

Cabe resaltar que al aplicar este método de detección hay que tener los respectivos cuidados de no indicar como detectados aquellas muestras en las que se sospeche de la existencia de una virosis causada por el mosaico de la coliflor o por una bacteriosis causada por *A. tumefaciens*, dado que pueden ocurrir infecciones naturales de cualquiera de los dos organismos en una siembra de maíz, dado que el virus posee un amplio rango de hospedantes, mientras que la bacteria, así como parientes cercanas a ellas, se encuentran de forma natural en el suelo (Wurz y Willmund, 1997).



b) Evaluación de la presencia de los genes PAT y BAR

Mediante la aplicación de la PCR en tiempo real se logró detectar la proteína PAT, con valores de Ct de 22.04 y 22.26 ($\Delta Ct < 0.5$), Coincidiendo con lo reportado por la “Community Reference Laboratory for GM Food and Feed” de la Unión Europea (2005), con diluciones del ADN de la muestra de 1:1 (Figura 6). Por otra parte, se señala que la proteína Bar no fue detectada.

La enzima PAT acetila la fosfinotricina en el extremo N-terminal, la misma no presenta actividad herbicida por sí misma, más bien la tolerancia al químico viene dada mediante la modificación del químico en lugar de modificar el objetivo de su actividad. Muchas plantas MG contienen el gen PAT que actúa como marcador de selección durante el desarrollo del transgénico (Wehrmann *et al.*, 1996). En esos casos, hay uno o más transgenes adicionales en la planta y el producto final no es necesariamente tolerante al glufosinato de amonio (Lutz *et al.*, 2001).

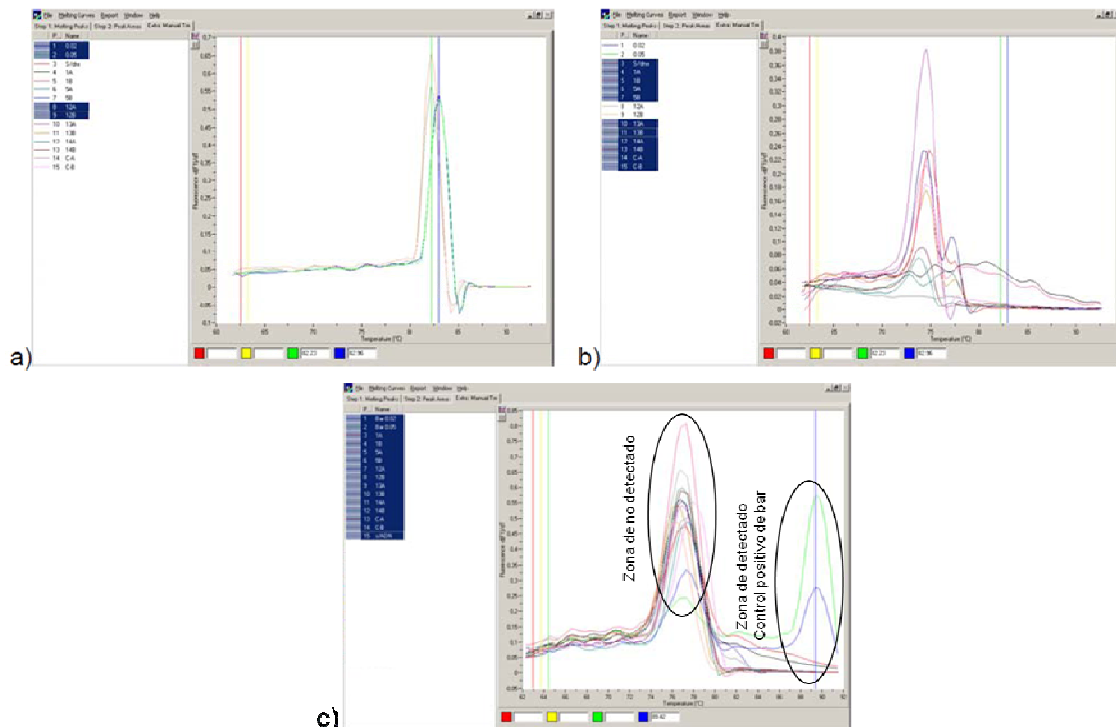


Figura 6. PCR en tiempo real para detectar el gen asociado con la proteína PAT. (a) Muestras positivas; (a) Muestras negativas. (c) prueba de comprobación para el gen BAR.

En el entendido de que ninguna de las pruebas antes aplicadas son concluyentes para indicar si un cultivar es o no transgénico, se procedió a aplicar una prueba adicional con el fin de confirmar el origen transgénico de la muestra 12 y la identificación exacta de la secuencia modificada genéticamente. La misma se inició con una búsqueda en los portales de: 'http://www.shgmo.org', del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio de Diversidad Biológica (http://www.bch.cdb.int), así como en el "Center for Environmental Risk Assessment" (http://www.cera-gmo.org), tomando como criterios que la muestra comercial 12 fue detectada para P35S, Tnos y PAT. De tal búsqueda se desprendió que los eventos Bt-11, T25 y TC1507 tienen una mezcla de estos promotores y terminadores, de ellos, el único que cumple perfectamente con la existencia de los tres reguladores es el evento TC1507, está registrado con el identificador único de la OECD DAS-ø15ø7-1, el cual fue registrado por las empresas "Pionner Hi-Breed International" y "Mycogen Seed", sin embargo se hizo la prueba empleando los cebadores también para los eventos Bt-11 y T25, con el fin de descartar que posiblemente hubiesen algunos de estos dos eventos de transformación.

c) Identificación del evento específico TC1507

Se pudo confirmar por PCR tiempo real, que la muestra comercial 12 es un cultivar de maíz que contiene el evento de transformación DAS-ø15ø7-1, asociado a la resistencia a herbicidas y tolerancia a insectos lepidópteros (Figura 7).

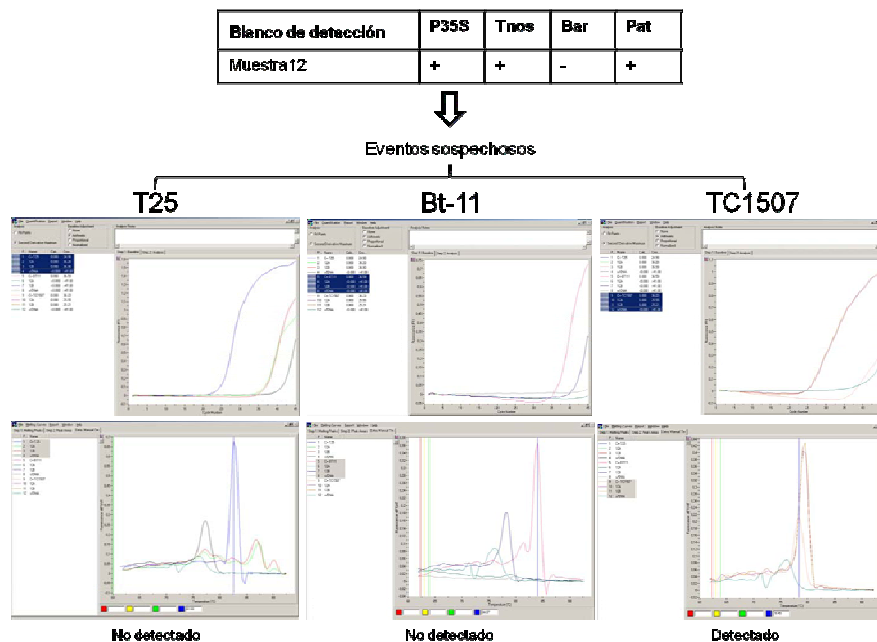


Figura 7. Productos de amplificación de la construcción específica asociada al evento de transformación transgénica de maíz DAS-ø15ø7-1, resistente a herbicidas y tolerante a insectos lepidópteros, mediante la aplicación de la estrategia de la PCR Tiempo Real.

El evento DAS-ø15ø7-1, ha sido desarrollado de la línea de maíz 1507, y fue transformado mediante el uso de la tecnología de aceleración de partículas empleando el fragmento de ADN PHI8999A quien presenta dos casetes de modificación (Documento 308/E3 de Dow AgroScience). El primero presenta una versión truncada de cry1F derivada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* que le confiere resistencia a los insectos plaga *Ostrinia nubilis*, *Spodoptera frugiperda*, *Agrotis* sp. y *Diatraea* sp., bajo la regulación del promotor ubiquitín ubiZM1 (2) derivado de maíz y del terminador ORF25polyA de *A. tumefaciens* pTi5955; el segundo posee una versión sintética de PAT derivado de *S. viridochromogenes*, que le confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, bajo la regulación del P35S, quien actúa como promotor y terminador de esta secuencia MG (Decisión 2005/772/EC).

Dicho evento de transformación, ha sido aprobado en EEUU (Documento aprobatorio 00-136-olp, 2000), Canadá (Documento aprobatorio DD2002-41, 2002), Argentina (Resolución 143 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2005), Colombia (Acta 5 del 17 octubre 2006 - numeral 2 (Maíz DAS-01507-1) de la Sala Especializada de Alimentos y Bebidas Alcohólicas (SEABA) del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos –INVIMA–), Europa (Commission Decision 2006/197/EC of 3 March 2006, OJ L 070 , 09/03/2006) y Brasil (Parecer Técnico de la Comissão Técnica Nacional de Biossegurança N° 1679/2008). Como se entiende dicho cultivar está aprobado de usar en todos los países de la región, más la Unión Europea, quizás por el hecho de presentar conjuntamente dos características agronómicas importantes para los agricultores, además de no tener mayor inconvenientes desde los puntos de vista ambientales (Documento aprobatorio DD2002-41, 2002; Dubelman, *et. al.*, 2005; Buntin, 2008), nutricionales y de salud (Mackenzie *et. al.*, 2006).

Según los resultados derivados en esta investigación se obtuvo que de doce (12) materiales comerciales de maíz evaluados, uno (01) es un OVM, ello quiere decir que en Venezuela ya se han liberado al ambiente, para uso comercial, organismos transgénicos. También resulta interesante citar que el evento DAS-Ø15Ø7-1 proviene de líneas o híbridos de color amarillo, resultado que no concuerda con la muestra obtenida en esta investigación, en donde la muestra es de color blanco. Esto tiene lógica, pues se sabe que en Venezuela para la obtención de harina precocida se usa al maíz blanco como materia prima.

No se tiene certeza de cómo este material llegó a los campos maiceros del país. Quizás este sea un ejemplo de movimiento transfronterizo ilícito, dado que el mismo se realizó en contravención de las medidas nacionales que rigen la aplicación del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. Dicho cultivar fue comprado y distribuido por el mismo gobierno venezolano, quién mediante la empresa socialista Agropatria adquirió dicho material. Recordemos que Venezuela ha suscrito diferentes convenios de cooperación agrícola con muchos de estos países en donde está aprobado de usar este evento de transformación. También se resalta el hecho innegable de que en la práctica el país no realiza ningún tipo de pruebas para conocer el estatus de modificación genética del material sujeto de introducción al país, siendo de particular importancia para el Estado la ejecución de esta labor debido a la política nacional.

Otra teoría, que cobra mucho menos fuerza es la relacionada con que pudo haber ocurrido el ingreso de este cultivar, mediante los “camino verdes” de Brasil o Colombia a Venezuela, pues como se mencionó con anterioridad, en estas naciones este evento está aprobado para alimentación humana, animal y para liberación al ambiente. También, resulta interesante resaltar que muchos eventos apilados poseen este evento transgénico, entre los cuales se pueden mencionar DAS-Ø15Ø7-1xMON-ØØ6Ø3, DAS-Ø15Ø7-1xDAS-59122-7 y DAS-Ø15Ø7-1xMON-ØØ6Ø3xDAS-59122-7, motivo por el cual no solo podría hablarse del evento DAS-Ø15Ø7-1, sino de cualquiera de estas combinaciones que podrían estar usándose por parte de agricultores, en nuestros campos venezolanos.

Con respecto al uso de las nuevas tecnología por parte de pequeños agricultores se indica que aparentemente estos no han tenido acceso a las nuevas tecnologías, cosa que no ha ocurrido en otros países, siendo ejemplo Colombia, Uruguay y Paraguay, en donde los pequeños agricultores mediante contrabando accedían al uso de semillas transgénicas en sus unidades de producción. Según Núñez (2005), las semillas de los cultivos transgénicos son desconocidas por los pequeños productores de maíz del país, pues las mismas son incompatibles con las prácticas agroecológicas y los principios de sustentabilidad de este tipo de sistemas de producción.

Consideraciones finales

El muestreo de las semillas permitió obtener muestras que aseguraran resultados de calidad confiables tanto en los ensayos de evaluación directa (tiras de flujo lateral), así como en los análisis de detección e identificación de OVM basados en ADN.

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

El método de extracción utilizado fue adecuado pues se desarrolló específicamente para extraer ADN en matrices poco procesadas, tales como semillas, por ello al aplicar las respectivas PCR se logró determinar que la integridad y calidad del ADN extraído fue adecuado.

De acuerdo con los principios para la detección y cuantificación de OVM, se logró amplificar de manera adecuada el gen endógeno de referencia asociado con la invertasa de maíz sólo en las muestras que se correspondieron con la especie.

De la aplicación de la estrategia “screening general”, se logró la detección del P35S, Tnos y pat en la muestra comercial 12, esto dio pie a la detección del evento de transformación DAS-Ø15Ø7-1 asociado con la resistencia a herbicidas y tolerancia a insectos lepidópteros.

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

Bibliografía consultada

1. **Association of Official Seed Analysis.** 1985. Rules for testing seeds. J. Seed Technol. 6: pp. 111-114.
2. **Broll, H., U. Wagner, A. Spilgelberg, J. Zagon y M. Schauzu.** 1998. Anwendung von methoden zum nachweis von veränderten sojabohnen und gentechnisch veränderten maiz in handel befindlichen lebensmitteln. J. Bundesgesundhblatt. 12p.
3. **Cartay, R.** 2000. El consumo de maíz en Venezuela. En: el maíz en Venezuela. Eds: H. Fontana y C. González. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. 530p.
4. **Cazzola, M. y S. Petruccelli.** 2006. Semiquantitative analysis of genetically modified maize and soybean in food. Electronic Journal of Biotechnology. 9 (3).
5. **Chen C., C. Andrew, C. Baskin y J. Delouche.** 1972. Influence of quality of seed on growth, development and productivity of some horticultural crops. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 37: 923 – 939.
6. **Código de Ética para la Vida.** 2001. Documento del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de la República Bolivariana de Venezuela. 134p.
7. **Conceição, F., A. Nunes y P. Binsfeld.** 2006. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. Ciência Rural. 36 (1).
8. **Di Bernardo G, S. Del Gaudio, U. Galderisi, A. Cascino, y M. Cipollaro.** 2007. Evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. Biotechnology Program. 23: 297-301.
9. **Documento aprobatorio 00-136-olp.** 2000. Dossier técnico para la desregulación del evento TC1507 en EEUU.
10. **Documento aprobatorio DD2002-41.** 2002. Determination of the Safety of Dow AgroSciences Canada Inc. and Pioneer Hi-Bred International's Insect Resistant and Glufosinate - Ammonium Tolerant Corn (Zea mays L.) Line 1507
11. **Dubelman, S., B. Bonnie, C. Bader, C. Brown y D. Vlachos.** 2005. Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use. Environ. Entomol. 34 (4): pp. 915-921
<http://www.bch.cdb.int>. Revisado en diciembre de 2012.
12. <http://www.cera-gmo.org>. Revisado en diciembre de 2012.
13. <http://www.shgmo.org>. Revisado en diciembre de 2012.
14. <http://www.shgmo.org>. Revisado en diciembre de 2012.
15. **Ehlers, V., S. Goltz, D. Kubsch, H. Wagner, H. Maidhof, J. Bendiek, B. Appel y H. Buhk.** 1997. Nachweis gentechnischer veränderungen in mais mittels PCR. Bundesgesundhbl. 4/97 : pp. 118-121.
16. **Gordon-Kamm W., T. Spencer, M. Mangano, T. Adams, R. Daines, W. Start, J. O'brien, S. Chamber, W. Adams, N. Willetts, T. Brice, C. Mackey, R. Krueger. A. Kausch y P. Lemaux.** 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant cell. 2: pp. 603-618.
17. **Gryson, N.** 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. Anal Bioanal Chem 396: pp. 2003–2022.
18. **Hemmer, W.** 1997. Foods derived from genetically modified and detection methods. En: BATS report. Agency for Biosafety research and assessment of technology impacts of the Swiss priority programme biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland. 2/97. pp. 40-44.
19. **Hernández, M.; T. Esteve y M. Pla.** 2005. Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower and wheat. J. Agric. Food Chem. 53: pp. 7003-7009.
20. **Huang, Y. y E. Dennis.** 1989. Factors influencing stable transformation of maize protoplasts by electroporation. Plant cell tissue cults. 18: pp. 281-296.

21. **Ishida, Y., H. Saito, S. Otha, Y. Hei, T. Komari y T. Kumashiro.** 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature biotechnology*. 14 (6): pp. 745-750.
22. **ISO 21568: 2006.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Toma de muestra.
23. **ISO 21569: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos.
24. **ISO 21570: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos.
25. **ISO 21571: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos.
26. **ISO 21572: 2004.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos basados en proteínas.
27. **ISO 24276: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Requisitos generales y definiciones.
28. **International Seed Testing Analysis (ISTA).** 2003. Proceeding of the 16th annual symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty. Supplement to volume 1. 95p.
29. **James, C.** 2013. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2012. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
30. **James, D., A. Smchmidt, E. Wall, M. Green y S. Masri.** 2003. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5829 – 5834.
31. **Klein, T., L. Kornstein y M. Fromm.** 1990. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment and the influence of methylation on foreign gene expression. In: Gustafson J. P (ed.). *Gene manipulation in plant improvement*. New York, Plenum Press. pp. 265-288.
32. **Lentini, Z.** 2000. Biotecnología en el fitomejoramiento del maíz. En: *el maíz en Venezuela*. Eds: H. Fontana y C. González. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. 530p.
33. **Lipp, M., E. Anklam y J. Stave.** 2000. Validation of a immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*. 83 (4): 919-927.
34. **Lipp, M., P. Brodman, K. Pietsch, J. Pauwel y E. Anklam.** 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybean and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*. 82 (4): 923-928.
35. **Longo, F. e I. Galindo.** 2006. Métodos de detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en la cadena agroalimentaria: conceptos para su aplicación. Publicaciones del Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe y de la Red Regional de Bioseguridad. 63 p.
36. **López, M., P. Mayorquin y M. Vegas.** 2003. Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de vigilancia tecnológica. Ediciones de Genoma España, sector agroalimentario. 78p.
37. **Lutz K., J. Knapp and P. Maliga.** 2001. Expression of bar in the Plastid Genome Confers Herbicide Resistance. *Plant Physiology*. 125: pp. 1585–1590.
38. **MacKenzie S., I. Lamb, J. Schmidt, L. Deege, M. Morrissey, M. Harper, R. Layton, L. Prochaska, C. Sanders, M. Locke, J. Mattsson, A. Fuentes y B. Delaney.** 2006. Thirteen week feeding study with transgenic maize grain containing event DAS-Ø15Ø7-1 in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 45: pp. 551–562.
39. **McClintonk, B., T. Kato y A. Blumenschein.** 1981. Constitución cromosómica de las razas de maíz. Libro del Colegio de Postgraduados de la Univ. de Chapingo, Mexico. 168p.
40. **Meyer, R.** 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMO in food. *Food Control*. 10: pp. 391-399.
41. **Murry, L., J. Jhonson y S. Nichols.** 1989. Transient expression of β -glucuronidase in electrotransformed corn embryos. *Am. J. Bot.* 77: 151a.
42. **Oropeza, H., C. Márquez y D. Nuñez.** 2000. Tecnología de la producción de semillas. En: *el maíz en Venezuela*. Eds: H. Fontana y C. González. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. 530p.
43. **Parecer Técnico de la Comissão Técnica Nacional de Biossegurança Nº 1679/2008.** Assunto: Liberação Comercial de milho geneticamente modificado.
44. **Permingeat, H.; R., M. Reggiardo, and R. Vallejos.** 2002. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and realtime PCR. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4431-4436.
45. **Pietsch, K., H. Waiblinger, P. Broddman y A. Wurz.** 1997. Screening method for the detection of genetically modified plants. *Dtsch Lebens Rundsch*. 93: pp. 35-38.
46. **Quirasco, C. B., Schoel, J. Plasencia, J. Fagan y 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. *Journal of AOAC Internacional*. 87 (3): pp. 639-646.

47. **Resolución 143 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.** 2005. Aprobación del uso del maíz TC1507 para alimentación humana, animal y liberación al ambiente, en la República Argentina.
48. **Rochedo, F., A. Nunes y P. Canisio.** 2006. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Ciencia Rural*. 36 (1). doi 10.1590/s0103-84782006000153.
49. **Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.** 2000. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: Texto y Anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
50. **Tengel, C., P. Schubler, E. Setze, J. Balles y M. Sprenger.** 2001. PCR- Based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Biotechniques*. 31 (2): 426 – 429.
51. **Thion L., C. Vossen, B. Couderc, M. Erard and B. Clemencon.** 2002. Detection of Genetically Modified Organisms in Food by DNA Extraction and PCR Amplification. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Education*. 30 (1): 51-55.
52. **Van Duijn G., R. van Biert, H. Bleeker-Marcelis, I. Van Boeijen, A. Jama, S. Jhakrie, y M. Hessing.** 2002. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods by Protein- and DNA-Based Techniques: Bridging the Methods. *J. of AOAC International*. 85 (3): pp. 787-791.
53. **Van Duijn, G., R. van Biert, H. Bleeker-Marcelis, H. Peppelman y M. Hessing.** 1999. Detection methods for genetically modified crops. *Food control*. 10: pp. 375-378.
54. **Wehrmann A., A. Van Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz.** 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature biotechnology*. 14: pp. 1274-1278.
55. **Wurz, A. y R. Willmund.** 1997. Identification of transgenic glyphosate-resistant soybean. In: G. A. Schreiber y K. Bogl (eds). *Food produced by means of genetic engineering. 2nd status report*. BgVV-heft 1/1997. Berlín. pp. 115-117.
56. **Zambrano, A.; J. Demey, G. Martínez, F. Fuenmayor, Z. Gutiérrez, G. Saldaña y M. Torrealba.** 2002. Método rápido, económico y confiable de mini preparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Revista Agronomía Tropical*. 52 (2): 235 – 243.
57. **Zhang D. y J. Guo.** 2011. The development and standardization of testing method for genetically modified organisms and their derived product. *Journal of Integrative Plant Biology*. 53 (7): pp. 539-551.
58. **German Federal Foodstuff Act.,** 1998; Reporte N° XXIV/98/A3/001 de la Unión Europea.
59. **Documento 308/E3 de Dow AgroScience.** Dossier técnico para la desregulación del evento TC1507 en Europa.
60. **Stave, J.** 1999. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO - future needs. *Food Control*. 10: 367-374.
61. **Paterniani, E.** 2000. Métodos de mejoramiento genético de poblaciones de maíz. En: *el maíz en Venezuela*. Eds: H. Fontana y C. González. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. 530p.
62. **Chen Lin, R., Z. Song, L. Bi y T. Yun-Kuang.** 2001. A rapid and efficient DNA miniprep suitable for screening transgenic plant. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 379a-379e.
63. **Stave, J.** 2002. Protein Immunoassay Methods for Detection of Biotech Crops: Applications, Limitations, and Practical Considerations. *J. of AOAC International*. 85 (3): 780-786.
64. **Hernández, M., D. Rodríguez, T. Esteve, S. Prat y M. Pla.** 2003. Development of melting temperature-based SYBR green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *J. Analytical Biochemistry*. 323: 164-170.

Capítulo V

Detección e identificación de eventos asociados a Organismos Vivos Modificados en semillas de soya (*Glycine max* L. Merrill) empleando los métodos de inmunoensayos y análisis por PCR en tiempo final y real

Resumen

La soya transgénica tolerante al glifosato es uno de los Organismos Vivos Modificados (OVM) más comercializados a nivel mundial, tanto que el 85% del comercio internacional de este cultivo se basa en este tipo de materiales. También se sabe que Venezuela es un importador de materias primas y productos procesados de países en donde el uso de OVM es una práctica común, resaltando en este aparte la entrada de nuestro país en el Mercosur. Por tales razones, se procedió a evaluar el estado de uso de las nuevas tecnologías para la producción de alimentos en el país, mediante el estudio de secuencias asociadas a OVM en semillas de soya. Se realizó un muestreo del 100% de las semillas de los cultivares de soya sembrados en 2010, constituido por cinco (05) cultivares comerciales y dos (02) 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 “screening general primario” empleando secuencias de “primers” que anclaron en la región común a varias secuencias transgénicas (Promotor 35S y Terminador NOS). De dicha evaluación, se obtuvo que una de las muestras resultó detectada 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 reporte en Venezuela del uso de semillas de OVM en el cultivo de soya, con el agravante de que los mismos no están autorizados de usarse en el país, por lo que tal actividad está catalogada como ilícita. Por tal motivo, se sugiere aumentar los controles aduanales para evitar la entrada de este tipo de materiales o sincerar la situación nacional en bioseguridad, mediante el desarrollo de las leyes específicas en la materia, con el fin de evitar tales ambigüedades entre las opiniones del Estado y la posición de los productores agropecuarios.

Palabras claves: detección, organismos vivos modificados, semillas, soya.

Introducción

Los humanos han manipulado, y manipulan, 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, y la profundización en los conocimientos en diversas áreas de la ciencia relacionadas con genética, nace la ingeniería genética y con ella los Organismos Vivos Modificados (OVM) o transgénicos, los cuales son definidos por el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (PCB) (2000), del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) (1992), 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 a nivel mundial son la soya, el maíz, el algodón y la canola, registrando un notable aumento del área sembrada desde 1996 hasta el 2011. Así mismo, el número de países que han adoptado los cultivos biotecnológicos, también han ascendido significativamente, en ese mismo período; motivo por el cual se señala que esta industria ha crecido de manera

exponencial y en la actualidad es uno de los sectores científicos y económicos más estables a nivel mundial (James, 2012).

Los principales países productores de OVM en el mundo son EEUU, Brasil, Argentina e India. Del total de países productores, el 60% están ubicados en América, quienes aportan un área de 128 millones de hectáreas, las cuales representan el 88% de la producción mundial de OVM, discriminados en 52% para EEUU y Canadá y 36% para países de América Latina (de economías emergentes) (James, 2012). Por esta razón, América es considerado un continente biotecnológico.

Se sabe también que la industria biotecnológica está en manos de pocas empresas desarrolladoras de este tipo de tecnologías (Brugés, 2005), motivo por el cual se hace importante desarrollar métodos de detección de eventos transgénicos, por una parte para evitar la utilización de la tecnología sin pagar los debidos privilegios por derechos de propiedad intelectual, por otra, para aplicar las reglamentaciones que cada país imponga sobre el uso de nuevas tecnologías, las cuales pueden variar desde la total prohibición del uso de OVM, hasta la negativa de utilizar algunos cultivos y/o eventos transgénicos, y finalmente para declarar el origen transgénico, y su proporción, a los consumidores que así lo exijan (Longo y Galindo, 2006; Conceição, Nunes y Binsfeld, 2006; Ferreira *et. al.*, 2012).

Actualmente Venezuela rechaza el uso de OVM producidos por empresas transnacionales (Gaceta Oficial N° 38.942), motivo por el cual se puede señalar que en el país existe una especie de moratoria. También es importante indicar que el Estado ha establecido diversos tratados de cooperación e intercambio agrícolas, 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 realizan 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 las cadenas agroproductivas del país.

En esta investigación se hace la evaluación de las semillas dado que las mismas son el insumo de inicio de todo sistema de producción, además que si se demuestra la existencia de semillas OVM quiere decir que seguramente se han realizado liberaciones al ambiente de este tipo de materiales, y por tanto se están empleando dichas tecnologías de forma ilegal. Por ello, el objetivo propuesto para conocer el estado actual del uso de OVM en semillas de soya se basó en estudiar la presencia y las características de secuencias de ADN asociadas a modificaciones genéticas comerciales en semillas de soya en la cadena agroalimentaria del país, mediante la detección molecular del Promotor 35S y Tnos (estrategia del “screening primario”) y de la determinación del evento específico GTS 40-3-2, el cual le confiere a la soya tolerancia al herbicida glifosato, todo ello haciendo comparaciones con la normativa vigente internacional en cuanto a los ensayos de laboratorios para detección e identificación de OVM.

Materiales y métodos

Selección y obtención de las semillas objeto de estudio

Para la selección de los nombres comerciales de las semillas objeto de estudio, se revisó la base de datos de los cultivares elegibles de soya del Servicio Nacional de Semillas (SENASSEM), para el período de siembra 2009-2010 en Venezuela. Las muestras

seleccionadas representaron al 100% de los cultivares sembrados en las zonas productoras de soya, las cuales están básicamente concentradas hacia el oriente del país (Cuadro 1). Adicionalmente, fueron colectadas muestras categoría “común”, donadas por el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos del INIA, siendo estos materiales empleados por pequeños productores de soya del país, básicamente en sistemas de producción tradicional.

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

Origen	Representante Legal	Año de Liberación	Categoría de clasificación en el laboratorio
Costa Rica / Venezuela	UCLA	2007	Control negativo
Argentina*	Monsanto	n/a	Control positivo
Brasil	Diproagro	2007	Muestra comercial 1
Brasil	Diproagro	2007	Muestra comercial 2
Venezuela	Monsanto	2009	Muestra comercial 3
Brasil	Diproagro	2007	Muestra comercial 4
Brasil	Diproagro	2005	Muestra comercial 5
n/a	n/a	n/a	Muestra Común 1
n/a	n/a	n/a	Muestra Común 2

*harina de material modificado genéticamente proveniente de la República Argentina, en un Convenio realizado entre el IDEA y el Laboratorio de Detección de OMG del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INTA). n/a: no aplica

Las muestras se obtuvieron del SENASEM, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras, ubicado en Maracay, estado Aragua; metodología similar fue realizada por Aguilera *et al.* (2008), en donde incluyó la evaluación de OVM autorizados para liberarse al ambiente en Europa. Cabe resaltar que no serán aclarados a personas naturales o jurídicas, públicas o privadas los nombre de los cultivares comerciales que se evaluaron en esta investigación pues en la actualidad no están autorizados en Venezuela el uso de semillas OVM para liberación al ambiente, o cualquier otro tipo de empleo. Por ello, y como una forma de aplicación de la norma bioética venezolana, tal información se considera “estrictamente confidencial” (Código de Ética para la Vida, 2003).

Para la obtención de las semillas, se aplicó un procedimiento de muestreo propuesto por el sistema de inspección de granos (GIPSA, por sus siglas en inglés), del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (2005), además de tomar en cuenta algunas consideraciones establecidas por la Asociación Internacional de Pruebas en Semillas (ISTA, 2003), para ensayos microbiológicos en semillas; ambos se basan en el muestreo por aceptación, por medio del cual se evalúa la calidad general de la semilla. Tal tarea se realizó de esta manera pues en la actualidad no se cuentan con procedimientos específicos de aplicar a materiales sospechosos de ser MG (Documento CX/MAS 08/29/8 del Comité del Codex Alimentarius sobre métodos de análisis y muestreo de OVM, 2008).

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 21568: 2006). 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 muestras de 300 a 400g por saco, con las cuales se armaron los pools de semillas de 2kg 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.

Preparación de las muestras de laboratorio

Una vez que las semillas fueron muestreadas, las mismas se trasladaron al Laboratorio de Detección y Cuantificación de Organismos Modificados Genéticamente, el cual está 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.

Para la molienda de las muestras se contó con un molinillo tradicional y casero de café, el cual previamente se limpió con ayuda de un paño humedecido con una solución de etanol al 70% (3 veces), y una vez con hipoclorito de sodio al 5%. Se esperaba a que se secara totalmente para utilizarse.

Se inició el procedimiento, moliendo 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. En cada tanda era colectado el polvo más fino, el cual quedaba adherido en las paredes del equipo, Tal harina era depositada en un vaso plástico desechable con ayuda de una espátula esterilizada, para ser homogeneizada y almacenada en un tubo de falcón de 50ml, previamente esterilizado. De ahí se separaron cinco (05) muestras de laboratorio, dos (02) sub-muestras de 5g de harina de soya se colocaron vasos plásticos descartables con el fin de realizar los inmunoensayos de evaluación directa, dos fueron colocadas en dos viales, llenando los mismos hasta la marca de 100uL, los cuales serían empleados en las pruebas de detección de transgenes basadas en ADN; y una se agregó en un vial totalmente lleno y se almacenó a temperatura ambiente en el laboratorio, la cual se constituyó en la muestra “stock” de laboratorio.

Aplicación de las tiras de flujo lateral

Las tiras de flujo lateral son una prueba de inmunoensayo similar a un test de embarazo en humanas, y se aplican como una estrategia previa para conocer de forma cualitativa la existencia o no de semillas de soya OVM (Stave, 1999; Stave, 2002). Para ello, se emplearon las tiras desarrolladas por la empresa “Strategic Diagnostic Inc.” de EEUU, para evaluar el evento de transformación transgénica GTS40-3-2 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 obtuvo agregando a las muestras de laboratorio 14ml de agua destilada estéril, se mezcló vigorosamente hasta obtener una mezcla, que a diferencia de Quirasco *et al.* (2004), no se realizó la centrifugación de la misma; en ella se introdujo una tira de flujo lateral. Se esperó a que fluyera el líquido por la tira, hasta observar que la banda control se coloreara, luego se extrajeron de la mezcla, se secaron con papel secante y se compararon con el patrón de referencia que posee el “kit”. La aparición de una línea (control), indica que la prueba se

desarrolló de manera adecuada, que las tiras funcionaron bien (no están vencidas) y que el cultivar puede considerarse negativo para el evento GTS 40-3-2, mientras que la aparición de dos bandas indica un resultado positivo (Lin, Chiang y Chih, 2001; Quirasco *et al.*, 2004)

Pruebas de Detección basadas en ADN

Todas las pruebas de detección basadas en ADN se realizaron por duplicado, empleando métodos de detección no normalizados por la "International Organization for Standardization (ISO)" (ISO 21570: 2005). Las mismas, se realizaron aplicando el esquema doble ciego, la primera repetición fue realizada por el autor principal de la investigación y la segunda prueba la ejecutó el Técnico Investigador encargado del Laboratorio de Detección y Cuantificación de Organismos Modificados Genéticamente del IDEA. Lo anterior se llevó a cabo como una aproximación a lo establecido en la norma ISO 21569: 2005, relacionada con detección cualitativa de OVM.

En todas las pruebas de este tipo, se utilizó un control negativo del transgén, que se corresponde con una soya producida por mejoramiento genético tradicional en Venezuela, un control negativo de PCR (reemplazando el ADN molde por agua), un control negativo de la especie específica (ADN de maíz) para el caso del gen endógeno de la lectina de soya, y un control positivo de transgénico el cual provino de un ADN extraído a partir de una harina que poseía el Laboratorio del IDEA, 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; James *et al.*, 2003). Una vez realizado el proceso de extracción, se comprobó la cantidad y calidad del ADN obtenido, tal como se encuentra descrito en los procedimientos de laboratorio propuestos por Tengel *et al.* (2001), Chen Lin *et al.* (2001), Zambrano *et al.* (2002) y Quirasco *et al.* (2004).

Aplicación de la PCR tiempo final para la amplificación del gen endógeno de soya y el "screening" general primario para el P35S y Tnos

Inicialmente se aplicó la prueba de detección para amplificar por PCR tiempo final los fragmentos de ADN asociados con un gen de copia única de la lectina de soya, los cuales solo están presente en esta especie. Posteriormente se procedió a estudiar las secuencias asociadas a varios eventos de transformación transgénica, evaluando las secuencias del promotor 35S (P35S) del virus del Mosaico de la Coliflor y del terminador de la nopalina sintetasa (Tnos) de *Agrobacterium tumefaciens* (Cuadro 2).

Cuadro 2. "Primers" empleados para evaluar las secuencias asociadas con el endógeno de soya y el "screening general" para el P35S y Tnos.

Método de detección	Blanco	Primer	Secuencia 5' → 3'	TA (°C)	TAP (pb)	Referencia
Especie específica	Endógeno	TM LEC F	TCCACCCCCATCCACATTT	60	81	Peano <i>et al.</i> , (2005). Nikolic <i>et al.</i> , (2008).
		TM LEC R	GGCATAGAAGTTGAAGGA			
"Screening" primario	P35S	P35S – U	GCTCCTACAAATGCCATCAGATAGT		195	Lipp <i>et al.</i> , (1999).
		P35S – L	GATAGTGGGATTGTG CGTCA			
	Tnos	NOS – A	GAATCCTGTTGCCGGTCTTGCG	63	127	Thion <i>et al.</i> , (2002).
		NOS – D	GCGGGACTCTAATCATAAAAACCC			

Las condiciones de reacción de la PCR y los programas del termociclador se variaron de acuerdo con el blanco de detección de interés, y los mismos se indican en el Cuadro 3. Con respecto a la detección del Tnos se indica que se realizó 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 “primers” o 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 GelDoc (BioRad).

Cuadro 3. Condiciones de reacción y programa de la PCR según el blanco de detección

Blanco de detección				Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Componente	Endógeno	P35S	Tnos			
Búfer	1X			Desnaturalización inicial	95	5
MgCl	4mM		1.25mM	Desnaturalización	95	0.5
Primer's	0.2µM	0.5µM		Alineamiento	(60) ^{E: P35S} (65) ^{Tnos}	0.5
dNTP's	0.2µM			Amplificación	72	0.5
Taq	0.625U			Amplificación final	72	5
DMSO	5%					
ADN	≈200ng					

Volumen final: 25µL.

E: endógeno.

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

Para identificar de forma directa el evento específico de transformación GTS 40-3-2, se procedió a realizar PCR, tanto tiempo final como real, sólo a aquellas muestras que dieron positivo para P35S y Tnos, tomando en consideración lo indicado en la investigación de Cazzola y Petrucceli, (2006) para la PCR en tiempo final y lo indicado en el “kit” comercial de Roche más abajo indicado, para PCR tiempo real. Las secuencias de primers empleadas para el desarrollo de ambas estrategias, fueron las siguientes: 5'ATCCCACTATCCTTCGCAAGA3' (forward) y 5'TGGGGTTTATGGAAATTGGAA3' (reverse), con una temperatura de alineamiento de 58°C y producto de amplificación de 169pb, para PCR en tiempo final (Cazzola y Petrucceli, 2006). Por su parte para la realización de la PCR en tiempo real, se usó el “kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I” de Roche Diagnostics. Las condiciones del programa de PCR del “kit” antes mencionado fueron utilizadas por defecto como lo señala su manual de procedimiento. En esta metodología se informó como detectado aquellas muestras que presenten pico de Tm en el rango característico y que tenga un Ct < a (Ct del control +2) (Hernández *et. al.*, 2003; Corbisier *et. al.*, 2005).

Resultados y Discusión

Tiras de flujo lateral

En la Figura 1, se observa que todas las bandas se tiñeron a nivel del control de detección, o sea que la prueba se aplicó de manera correcta y que las tiras no estaban vencidas; también puede observarse que ninguno de los cultivos de soja resultó ser positivo al evento de transformación GTS 40-3-2. A pesar de que la prueba se recomienda de aplicar, en campo o en aduanas, para la detección temprana de semillas y granos de OVM (Stave, 1999; Van Duijn *et al.*, 2002) por su facilidad de realización y rapidez en la obtención de resultados (Stave, 1999; Van Duijn *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 2000; Stave, 2002; Van Duijn *et al.*, 2002; Longo y Galindo, 2006), tiene como desventaja que sólo puede utilizarse en muestras con un mínimo, o ningún, procesamiento, pues es la única forma de garantizar que los resultados de la aplicación del método expresen los niveles de sensibilidad adecuados (López, Mayorquín y Vegas, 2003; Longo y Galindo, 2006; Rochedo, Nunes y Canisio, 2006).



Figura 1. Resultados de la aplicación de las tiras de flujo lateral en muestras comerciales de soya.

Es ese sentido, se señala que tales resultados, se deben en buena parte en que las semillas son sometidas a temperaturas que superan los 50°C, con el fin de disminuir la humedad de campo a la humedad apropiada de comercialización (Chen *et al.*, 1972; Association of Official Seed Analysis, 1985). Evidentemente el tratamiento térmico desnaturaliza a la proteína CP4 EPSPS y por tanto la misma pierde su estructura y no es reconocida en el sitio de unión del antígeno/anticuerpo en la tira de flujo lateral (Stave, 1999; Stave, 2002; Van Duijn *et al.*, 2002). Caso similar ocurre cuando se analizó diferentes tipos de tortillas de maíz mexicanas en donde se empleó como materia prima para su elaboración maíz del evento de transformación CBH 351, en donde los tratamientos térmico y físico-químico por la nixtamalización, no permitieron la detección de la proteína Cry9C, aunque si en la muestra de granos de maíz sin procesamiento (Quirasco *et al.*, 2004). Por ello se señala que las tiras de flujo lateral no son un método recomendable de utilizar en materiales con cierto nivel de procesamiento, tales como las semillas comerciales.

En relación con la aplicación del método, se señala que el mismo es repetible y reproducible dado que la utilización de “kit” comerciales permiten obtener resultados analíticos independientes e iguales, ya sea en el mismo laboratorio o en otro, siempre y cuando se cumpla el requisito de que se realice bajo las mismas condiciones, por distintos analistas y en intervalos de tiempo breves (Lipp *et al.*, 2000; ISO 21572:2004), tal y como se obtuvo en este estudio. Por ello, este método fue evaluado mediante prueba interlaboratorio sobre materiales de referencia de acuerdo con la norma ISO 5725 (Lipp *et al.*, 2000; ISO 21572:2004) y es recomendado por el Centro Común de Investigación de la Comisión Europea para detectar OVM bajo las condiciones ya reseñadas, obteniéndose en todos los casos los mismos resultados (Documento CX/MAS 08/29/8 del Comité del Codex Alimentarius sobre métodos de análisis y muestreo de OVM, 2008).

Extracción de ADN de las muestras de soya

El método de extracción utilizado fue adecuado pues se desarrolló específicamente para extraer ADN en matrices poco procesadas, como harinas de semillas y granos, así como en productos alimenticios con bajo contenido de lípidos y que no han recibido intensos tratamientos térmicos, entre los que destacan alimentos concentrados para humanos y animales y helados, entre otros (Cazzola y Petrucelli, 2006).

En la Figura 2, se observa que el rendimiento, la integridad y calidad del material genético extraído permitió obtener ADN genómico sin degradaciones que limitaran la realización de las pruebas moleculares de detección de transgenes. Ello quiere decir que el tratamiento térmico aplicado a la semilla modifica la estructura de la proteína transgénicas, más no la cantidad y calidad del ADN de las mismas. De esta manera, debido al poco procesamiento de las muestras se recomienda utilizar el “kit” comercial desarrollado por

Macherey Nagel, ya que así se estandarizan las condiciones entre laboratorios en cuanto a la extracción de ADN, cumpliéndose así con los requisitos reglamentarios internacionales en la materia (Lipp *et al.*, 1999; Thion *et al.*, 2002; ISO 21571: 2005; Di Bernardo *et al.*, 2007).

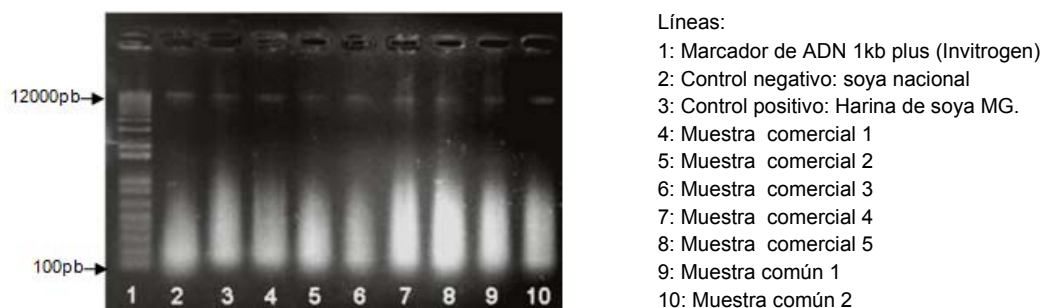


Figura 2. Análisis de la extracción de ADN de las muestras de soya objeto de estudio, en gel de agarosa al 1%.

Según Cankar *et al.* (2006) y Di Bernardo *et al.* (2007), la técnica de extracción de ADN es crucial para una buena detección y cuantificación de OVM, ya que el mismo influencia directamente los resultados de la PCR. Si no se realiza adecuadamente la extracción, entonces se obtendrán matrices de análisis contentivas de inhibidores que disminuyen la eficiencia de amplificación del transgen, que en el caso de la detección podrían obtenerse resultados indebidos (falsos positivos o falsos negativos), mientras que en el caso de la cuantificación podría subestimarse o sobreestimarse el contenido de OVM en el analito objeto de estudio.

Evaluación del Gen endógeno.

En ambas repeticiones se puede indicar que se logró amplificar de manera específica y adecuada 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, las cuales son las muestras contentivas de ADN de maíz y agua (Figura 3). Ello quiere decir que se estableció correctamente la identidad de la soya mediante la evaluación del gen de copia única de la lectina de soya (James *et al.*, 2003; Cazzola y Petrucci, 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). También se señala que evidentemente se eliminó de manera efectiva los inhibidores de la PCR, ya que no fueron observados los efectos de tales compuestos. Entonces, se concluye que tanto la extracción de ADN, así como la PCR para evaluar la identidad de la soya, se realizó de forma correcta, ya que los resultados obtenidos de manera independientes son similares entre sí, lo cual le da el carácter de repetibilidad al ensayo (ISO 24276: 2005).

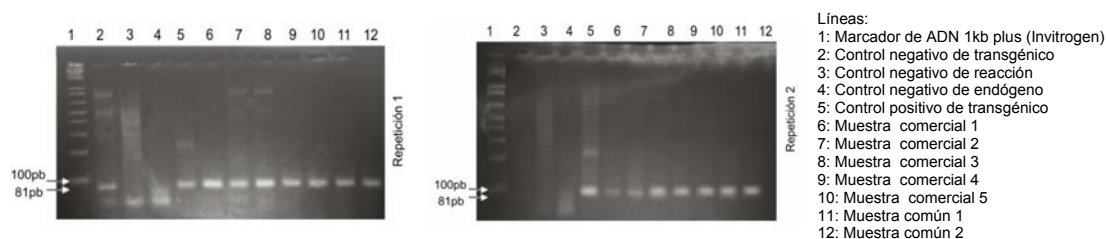


Figura 3. Amplificación del gen de la lectina en muestras comerciales de semillas de soya.

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 obtuvo en las tortillas preparadas con granos de maíz con poco procesamiento.

El método empleado en esta investigación fue validado en estudios colaborativos organizados por el grupo de trabajo de “Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética”, del “German Federal Institute for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine” (German Federal Foodstuff Act., 1998; Reporte N° XXIV/98/A3/001 de la Unión Europea). Para la extracción del ADN, se utilizó el método del CTAB, y como diana específica del taxón (gen endógeno), se empleó la secuencia descrita en la base de datos del GenBank bajo el número de acceso K00821 (Hernández *et al.*, 2005; Zhang y Guo, 2011). Como resultado obtuvieron que el método sólo amplifica el ADN asociado con el gen endógeno de la especie de interés, por tanto se puede asegurar que el mismo presenta una alta especificidad para ADN obtenido a partir de harina de soya. Similares resultados señalan Broll *et al.*, (1998) y Meyer, (1999).

Aplicación de la estrategia “screening” general primario.

d) Evaluación de la presencia del Promotor 35S del Virus del Mosaico de la coliflor

La estrategia empleada en esta investigación fue diseñada para reconocer de forma específica a la secuencia descrita en el GenBank con el número de acceso V00141. Los resultados de la Figura 4 indican que la muestra comercial 5 presentó la banda de 195pb (Línea 9), la cual está asociada con la existencia del P35S. El promotor, puede encontrarse inserto desde una copia hasta un número variable de copias en el genoma de la planta de soya (Hemmer, 1997; Pietsch *et al.*, 1997).

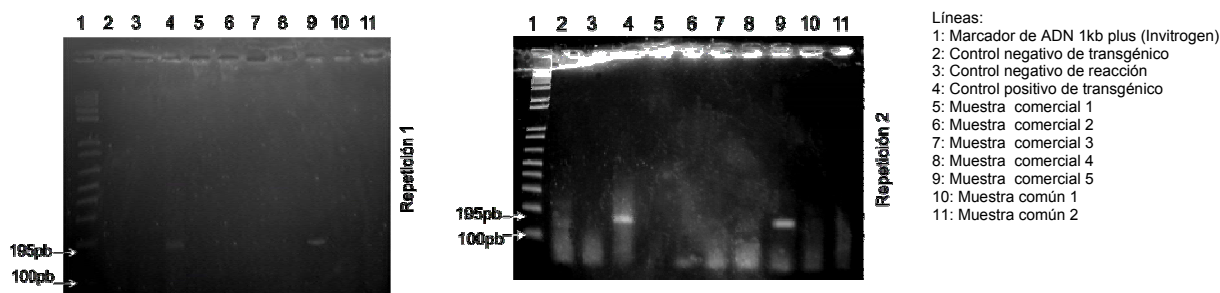


Figura 4. Productos de amplificación del P35S en muestras comerciales de semillas de soya.

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 que 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 de 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 21569: 2006).

En el caso de la soya, se señala que al hacer una revisión el portal '<http://www.shgmo.org>' se pudo determinar que el evento de transformación GTS 40-3-2 posee un inserto simple que contiene un "enhancer" del P35S de CaMV asociado con un péptido de tránsito unido al cloroplasto de *Petunia hybrida*, lo cual se corresponde con los resultados antes indicados. También 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 u Solanaceae (Brunt *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1997), en donde pueden ocurrir infecciones naturales del CaMV y por tanto arrojar resultados de falsos positivos, motivo por el cual deben realizarse en esos casos pruebas adicionales para confirmar la existencia del P35S (German Federal Foodstuff Act., 1998; Reporte N° XXIV/98/A3/001 de la Unión Europea).

e) Evaluación de la presencia del Terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*

La estrategia empleada se diseñó para reconocer la secuencia diana asociada con el Terminador Nopalina Sintetasa (Tnos) de *A. tumefaciens*, la cual se encuentra registrada en el GenBank con el número V00087. Los resultados indican que la muestra comercial 5 presentó la banda de 127pb (Línea 9, Figura 5), ya que la misma presenta similitud en tamaño al ser comparada con el producto del control positivo de reacción (Línea 4, Figura 5). La detección de ese fragmento de 127pb indica que la muestra problema 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 lo recomiendan de aplicar 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 ellas, se encuentran de forma natural en el suelo (Wurz 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 21569: 2006).

En el entendido de que ambas pruebas no son concluyentes dado que la literatura especializada las señala como estrategias de detección general por medio de la cual se evalúa con mayor detalle la amplificabilidad del ADN que contiene la secuencia diana de interés, se procedió a aplicar una prueba adicional con el fin de confirmar el origen transgénico de la muestra y la identificación de la secuencia modificada genéticamente. La misma se inició con una búsqueda en los portales de: '<http://www.shgmo.org>', del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio de Diversidad Biológica (<http://www.bch.cdb.int>), así como en el "Center for Environmental Risk Assessment" (<http://www.cera-gmo.org>), tomando como criterios que la muestra comercial 5 es positiva para P35S y Tnos. De tal búsqueda se desprendió que el evento GTS 40-3-2 cumple con los criterios antes indicados, motivo por el cual se procedió a evaluar mediante la aplicación de la estrategia evento específico, la detección de este evento de transformación.

f) Identificación del evento específico GTS 40-3-2

Se pudo confirmar tanto por PCR tiempo final, así como PCR por tiempo real, que la muestra comercial 5 es un cultivar de soya que contiene el evento de transformación asociado con la tolerancia al herbicida glifosato, comercializado en el ámbito agrícola como soya "Roundup Ready" (soya RR) (Figura 6 a y b) (German Federal Foodstuff Act.,

1998; Reporte N° XXIV/98/A3/001 de la Unión Europea). 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 (Tengel *et.al.*, 2001).

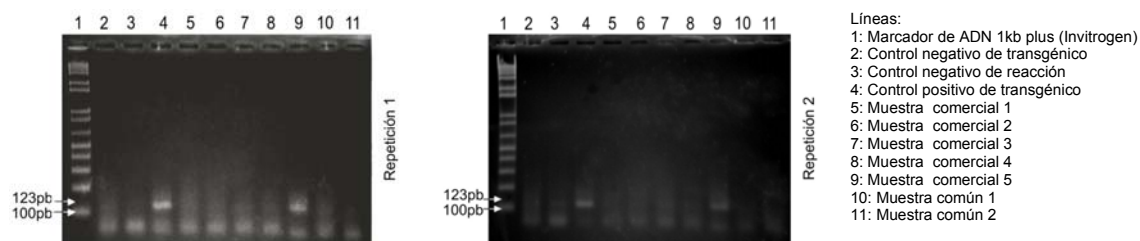


Figura 5. Productos de amplificación del Tnos de *A. tumefaciens* en muestras comerciales de semillas de soja.

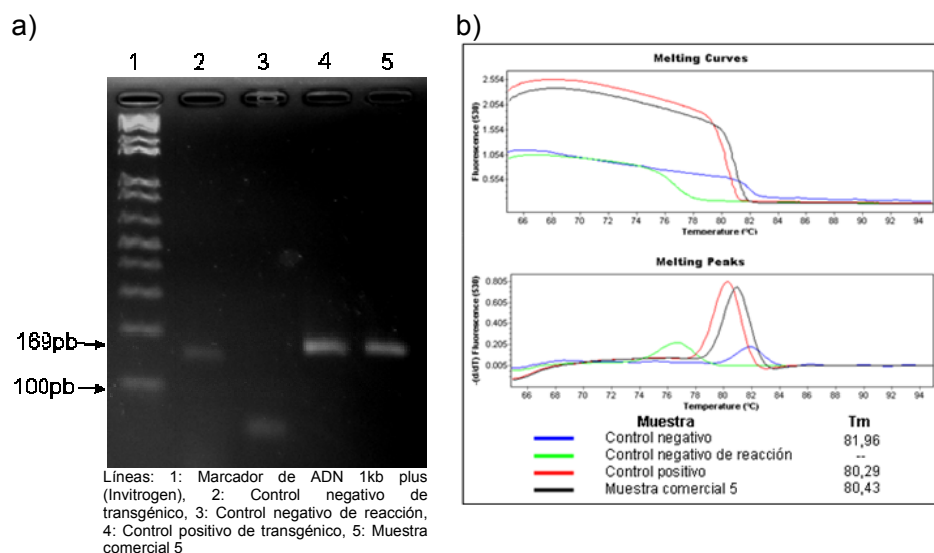


Figura 6. Productos de amplificación de la construcción específica asociada al evento de transformación transgénica de soja tolerante al herbicida glifosato. a) mediante la aplicación de la estrategia de la PCR tiempo final; b) mediante la aplicación de la estrategia de la PCR Tiempo Real.

Esta soja se liberó y adoptó en Argentina en 1996, y es considerado el primer producto biotecnológico que modificó el mercado de la producción de OVM en el mundo (James, 2011). Este evento fue desarrollado por la empresa transnacional Monsanto, con el fin de inhibir en la planta de soja la enzima 5-enolpiruvilsiquimato-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 tales organismos (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 (Padgett *et. al.*, 1995).

Los cultivares de soya RR normalmente son empleados en suelos altamente erosionados en donde las labores agronómicas de la preparación del suelo no es posible de realizar, motivo por el cual se debe hacer la siembra de forma directa, dándose así la misma posibilidad de crecimiento a las malezas que al cultivo (Padgett *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 con altos niveles de degradación por erosión y compactación (James, 2011).

Según los resultados derivados en esta investigación se obtuvo que de cinco (05) materiales comerciales de soya evaluados, uno (01) es un OVM, mientras que los pequeños agricultores evidentemente no han tenido acceso a las nuevas tecnologías. Ello quiere decir que en Venezuela ya se han liberado al ambiente, para uso comercial, organismos transgénicos, que en el caso de soya se corresponde con el evento de transformación GTS 40-3-2.

En visitas realizadas al Servicio Nacional de Semillas (SENASA) y a la Oficina de Cooperación “Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria” (EMBRAPA)/ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, se conoció que el cultivar que resultó ser detectado para el evento GTS 40-3-2, es un material que fue traído hace 6 años a Venezuela, en el marco de un convenio celebrado entre el Ministerio del Poder Popular de Agricultura y Tierras de la República Bolivariana de Venezuela y EMBRAPA, para sembrarse en la Mesa de Guanipa, estado Anzoátegui, o sea que el Estado venezolano es el responsable de la introducción de esta soya RR en el oriente del país. Según EMBRAPA esta soya proviene de mejoramiento genético tradicional y es empleada por productores del vecino país como cultivar por excelencia para la producción de soya no transgénica. De igual forma lo señala FundaCruz, la cual es una Asociación de Productores de Soya de Bolivia.

Consideraciones finales

El muestreo de las semillas se realizó basado en los estudios generados para evaluar los aspectos sanitarios y físicos de dichas estructuras, y el mismo permitió obtener muestras que aseguraran resultados de calidad confiables tanto en los ensayos de evaluación directa (tiras de flujo lateral), así como en los análisis de detección e identificación de OVM basados en ADN.

Se considera que las tiras de flujo lateral no son un método de detección recomendable de aplicar a las semillas dado que el procesamiento físico para disminuir la humedad de las mismas, compromete la estructura de la proteína transgénica y por tanto la misma no es reconocida de manera específica en el sitio de la banda diseñado para ello.

El método de extracción utilizado fue adecuado pues se desarrolló específicamente para extraer ADN en matrices poco procesadas, tales como granos y semillas, por ello al aplicar las respectivas PCR se logró determinar que la integridad y calidad del ADN extraído fue adecuado.

De acuerdo con los principios para la detección y cuantificación de OVM, se logró amplificar de manera adecuada el gen endógeno de referencia asociado con la lectina de soya.

En cuanto a la detección cualitativa de las secuencias asociadas con el P35S y Tnos, se detectó una (01) muestra, en siete (07) que contaba con ambos blancos de detección. Por ello, se procedió identificar, primero *in silico*, y luego en los respectivos ensayos de laboratorio la existencia de semillas OVM que se corresponden con el evento de transformación GTS 40-3-2.

La soya GTS 40-3-2, es un material modificado genéticamente desarrollado por una gran empresa biotecnológica transnacional. La misma le confiere resistencia al cultivo al herbicida glifosato. Se pudo conocer que este cultivar, es sembrado en Venezuela desde 2005, en el oriente del país, al menos así lo indica el registro de cultivares del SENASEM. Este cultivar, fue introducido por el Estado venezolano en un convenio realizado con gobierno de la República de Brasil, supuestamente bajo la figura de material “GMO free”. De lo que no hay duda es de la ambigüedad del verdadero origen del material y su siembra ilícita en campos venezolanos hace indicar que en el país se están usando OVM sin los debidos permisos de las autoridades encargadas de regular dichas actividades. El escenario anterior indica la necesidad de sincerar la situación nacional con respecto al uso de los OVM, ya sea aumentando los respectivos controles en aduanas, o desarrollando las leyes nacionales específicas para reglamentar los aspectos de bioseguridad en el país.

Bibliografía consultada

1. **Aguilera, M., M. Querci, S. Pastor, G. Bellochi, A. Milcamps y G. Van de Eede.** 2008. Assessing copy number of MON810 integrations in commercial seed maize varieties by 5' event specific real time PCR validated method couple to 2 $\Delta\Delta$ ct analysis. Food anal. methods. doi: 10.1007/s12161-008-9036-1.
2. **Association of Official Seed Analysis.** 1985. Rules for testing seeds. J. Seed Technol. 6: pp. 111-114.
3. **Broll, H., U. Wagner, A. Spigelberg, J. Zagon y M. Schauzu.** 1998. Anwendung von methoden zum nachweis von veränderten sojabohnen und gentechnisch verändertem maiz in handel befindlichen lebensmitteln. J. Bundesgesundheitsblatt. 12p.
4. **Bruges, M.** 2005. Bio-guía para periodistas: Biotecnología Agrícola. Publicaciones de Agrobio – Colombia. 74p.
5. **Brunt, A., K. Crabtree, M. Dallwitz, A. Gibbs y L. Watson.** 1996. Viruses of plant: description and list from the VIDE database. CABI, United Kingdom. 1484p.
6. **Cankar, K., D. Stebih, T. Drejo, J. Zel y K. Gruden.** 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/37>.
7. **Cazzola, M. y S. Petruccelli.** 2006. Semiquantitative analysis of genetically modified maize and soybean in food. Electronic Journal of Biotechnology. 9 (3).
8. **Chen C., C. Andrew, C. Baskin y J. Delouche.** 1972. Influence of quality of seed on growth, development and productivity of some horticultural crops. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 37: 923 – 939.
9. **Chen Lin, R., Z. Song, L. Bi y T. Yun-Kuang.** 2001. A rapid and efficient DNA miniprep suitable for screening transgenic plant. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 379a-379e.
10. **Codex Alimentarius Commission.** 2008. Resúmenes de las reuniones sobre los métodos para la detección e identificación de alimentos derivados de la biotecnología. Documento CX/MAS 08/29/8. Budapest, Hungría.
11. **Código de Ética para la Vida.** 2001. Documento del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de la República Bolivariana de Venezuela. 134p.
12. **Conceição, F., A. Nunes y P. Binsfeld.** 2006. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. Ciência Rural. 36 (1).
13. **Convenio sobre la Diversidad Biológica.** 1992. Organización de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
14. **Corbisier P., S. Trapmann, D. Gancberg, L. Hannes, P. Iwaarden, G. Berben, H. Schimmel y H. Emons.** 2005. Quantitative determination of Roundup Ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. Anal Bioanal Chem 383: 282–290.
15. **Di Bernardo G, S. Del Gaudio, U. Galderisi, A. Cascino, y M. Cipollaro.** 2007. Evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. Biotechnology Program. 23: 297-301.
16. **Ferreira, J., G. Almeida; A. Borém; W. Silva y T. Alemu.** 2012. Biosafety and Detection of Genetically Modified Organisms, Transgenic Plant, Advances and Limitations. Ozden, Y. (ed.). Intech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/transgenic-plants-advances-and-limitations/biosafety-and-detection-of-genetically-modified-organisms>.
17. **Gaceta Oficial N° 38.942,** con motivo del Día Internacional de la Diversidad Biológica del 30 de mayo de 2008.
18. **Gepts, P.** 2002. A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering. Crop Sci. 42:1780–1790
19. **German Federal Foodstuff Act.** 1998. Reporte N° XXIV/98/A3/001 de la Unión Europea.

20. **Handbook: Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration (GIPSA).** 2005. Federal Grain Inspection Service of United States Department of Agriculture.
21. **Harrigan, G., W. Ridley, S. Riordan, M. Nemeth, R. Sorbet, W. Trujillo, M. Breeze y 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.
22. **Hemmer, W.** 1997. Foods derived from genetically modified and detection methods. En: BATS report. Agency for Biosafety research and assessment of technology impacts of the Swiss priority programme biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland. 2/97. pp. 40-44.
23. **Hernández, M.; T. Esteve y M. Pla.** 2005. Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower and wheat. *J. Agric. Food Chem.* 53: pp. 7003-7009.
24. **Hernández, M., D. Rodríguez, T. Esteve, S. Prat y M. Pla.** 2003. Development of melting temperature-based SYBR green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *J. Analytical Biochemistry.* 323: 164-170.
25. <http://www.bch.cdb.int>. Revisado en diciembre de 2011.
26. <http://www.cera-gmo.org>. Revisado en diciembre de 2011.
27. <http://www.shgmo.org>. Revisado en diciembre de 2011.
28. **International Seed Testing Analysis (ISTA).** 2003. Proceeding of the 16th annual symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty. Supplement to volume 1. 95p.
29. **ISO 21568: 2006.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Toma de muestra.
30. **ISO 21569: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos.
31. **ISO 21570: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos.
32. **ISO 21571: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos.
33. **ISO 21572: 2004.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Métodos basados en proteínas.
34. **ISO 24276: 2005.** Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de Organismos Genéticamente Modificados y productos derivados. Requisitos generales y definiciones.
35. **James, C.** 2011. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2010. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
36. **James, D., A. Smchmidt, E. Wall, M. Green y S. Masri.** 2003. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51: 5829 – 5834.
37. **Lin, H., J. Chiang y D. Chih.** 2001. Detection of genetically modified soybean by PCR method and immunoassay kits. *Journal of food and drug analysis.* 9 (3): pp. 160-166.
38. **Lipp, M., E. Anklam y J. Stave.** 2000. Validation of a immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean ind food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. *Journal of AOAC International.* 83 (4): 919-927.
39. **Lipp, M., P. Brodman, K. Pietsch, J. Pauwel y E. Anklam.** 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybean and maize in dried powder. *Journal of AOAC International.* 82 (4): 923-928.
40. **Longo, F. e I. Galindo.** 2006. Métodos de detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en la cadena agroalimentaria: conceptos para su aplicación. Publicaciones del Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe y de la Red Regional de Bioseguridad. 63 p.
41. **López, M., P. Mayorquin y M. Vegas.** 2003. Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de vigilancia tecnológica. Ediciones de Genoma España, sector agroalimentario. 78p.
42. **Meyer, R.** 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMO in food. *Food Control.* 10: pp. 391-399.
43. **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. 62 p.
44. **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. *Journal Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 22/2008/3.
45. **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: pp. 1451-1461.

46. **Peano, C., R. Bordoni, M. Gulli, A. Mezzelani, M. Samson, G. De Bellis y N. Marmiroli.** 2005. Multiplex PCR and ligation detection reaction/ universal array technology for traceability of genetically modified organism in foods. *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/j.ab.2005.08.004.
47. **Pietsch, K., H. Waiblinger, P. Broddman y A. Wurz.** 1997. Screening method for the detection of genetically modified plants. *Dtsch Lebens Rundsch.* 93: pp. 35-38.
48. **Qiu, S., W. Wintermantel, Y. Sha y 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: pp. 180-188.
49. **Quirasco, C. B., Schoel, J. Plasencia, J. Fagan y 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. *Journal of AOAC Internacional*. 87 (3): pp. 639-646.
50. **Rochedo, F., A. Nunes y P. Canisio.** 2006. Deteccao e quantificacao de organismos genéticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Ciencia Rural*. 36 (1). doi 10.1590/s0103-84782006000153.
51. **Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.** 2000. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: Texto y Anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
52. **Stave, J.** 1999. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO - future needs. *Food Control*. 10: 367-374.
53. **Stave, J.** 2002. Protein Immunoassay Methods for Detection of Biotech Crops: Applications, Limitations, and Practical Considerations. *J. of AOAC International*. 85 (3): 780-786.
54. **Tengel, C., P. Schubler, E. Setze, J. Balles y M. Sprenger.** 2001. PCR- Based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Biotechniques*. 31 (2): 426 – 429.
55. **Thion L., C. Vossen, B. Couderc, M. Erard and B. Clemencon.** 2002. Detection of Genetically Modified Organisms in Food by DNA Extraction and PCR Amplification. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Education*. 30 (1): 51-55.
56. **Torres, A., W. Nascimento, S. Vasconcelos y F. Souza.** 2003. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. *J. Pesq. agropec. bras.* 38 (9): 1053-1057.
57. **Van Duijn G., R. van Biert, H. Bleeker-Marcelis, I. Van Boeijen, A. Jama, S. Jhakrie, y M. Hensing.** 2002. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods by Protein- and DNA-Based Techniques: Bridging the Methods. *J. of AOAC International*. 85 (3): pp. 787-791.
58. **Van Duijn, G., R. van Biert, H. Bleeker-Marcelis, H. Peppelman y M. Hensing.** 1999. Detection methods for genetically modified crops. *Food control*. 10: pp. 375-378.
59. **Wurz, A. y R. Willmund.** 1997. Identification of transgenic glyphosate-resistant soybean. In: G. A. Schreiber y K. Bogl (eds). *Food produced by means of genetic engineering. 2nd status report*. BgVV-heft 1/1997. Berlín. pp. 115-117.
60. **Zambrano, A.; J. Demey, G. Martínez, F. Fuenmayor, Z. Gutiérrez, G. Saldaña y M. Torrealba.** 2002. Método rápido, económico y confiable de mini preparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Revista Agronomía Tropical*. 52 (2): 235 – 243.
61. **Zhang D. y J. Guo.** 2011. The development and standardization of testing method for genetically modified organisms and their derived product. *Journal of Integrative Plant Biology*. 53 (7): pp. 539-551.

Consideraciones finales generales

A nivel mundial la situación del uso de OVM sigue siendo muy controversial, debido a la polarización del tema, pues algunos consideran a los OVM la solución a muchos de los problemas que actualmente enfrenta la población en relación con la disponibilidad de alimentos, mientras que otros asumen una actitud en contra, aduciendo razones diversas que varían desde el aumento de enfermedades en humanos, pasando por la pérdida de diversidad biológica hasta llegar a la dependencia tecnológica. De lo que no hay duda es que América, y particularmente la región latina, juega un papel preponderante en la producción de OVM en el mundo, en donde de las 170,3 millones de hectáreas que se sembraron y comercializaron de OVM a nivel internacional, en 2012, 146,4 millones de hectáreas son producidas por EEUU, Brasil, Argentina, Canadá, Paraguay y Uruguay.

A nivel internacional y nacional, existen diversos instrumentos jurídicos relacionados de manera directa e indirecta con el tema de regulación de la BM y sus aplicaciones. En general, los documentos internacionales parten del mismo principio de protección al ambiente y bienestar al humano. Por su parte, los aspectos regulatorios nacionales parten de los preceptos establecidos en la Constitución, y se basan en los principios de equidad e igual, conservación del ambiente, los procesos ecológicos, las comunidades indígenas y de las diferentes figuras de áreas protegidas existentes en el país, además de la soberanía e independencia de la nación. Vale resaltar que estos instrumentos no están integrados en un bloque único legal, por lo que se puede concluir que en el país no existe un sistema legal centralizado que rija la materia.

La política nacional actual en materia de seguridad de la biotecnología se basa en negar el uso de OVM sin conocer sus efectos sobre la salud humana, el ambiente y la economía nacional, hecho que se ve respaldado en muchas leyes, en donde se señalan que el Estado prohíbe la transferencia, utilización y liberación de OGM hasta tanto se demuestre su inocuidad para la conservación y utilización sustentable de la diversidad biológica y sus componentes, así como para el consumo humano y animal. Por este motivo puede considerarse que en Venezuela existe una moratoria sobre el uso, manejo y transferencia de OVM.

En relación con los métodos de detección se indica que estos son variados, y que la aplicación de uno u otro depende de los objetivos que se desean alcanzar, los recursos económicos con los que se cuenta y la disponibilidad de talento humano capacitado para realizar los ensayos de laboratorio, entre otros. Dichos métodos varían desde la revisión en computador de las decisiones de comercialización de nuevos eventos, hasta los métodos basados en el uso de microchips de ADN.

En cuanto al muestreo, se señala que en la actualidad aún no hay nada señalado en la literatura especializada sobre la forma y manera de realizar esta actividad, para la detección de secuencias asociadas a OVM. Por ello, diferentes comisiones trabajan arduamente en la creación de protocolos de muestreos válidos para la detección de OVM. Mientras tanto, el uso de los procedimientos establecidos por la Asociación Internacional de Pruebas en Semillas (ISTA), del sistema de inspección de granos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y del Codex Alimentarius siguen aplicándose. Dado el vacío al respecto, en esta investigación se realizó un muestreo por conveniencia, tomando en consideración los elementos básicos establecidos por cada uno de los procedimientos de las instituciones antes citadas, lográndose obtener muestras que aseguraron

resultados de calidad confiables tanto en los ensayos de evaluación directa (tiras de flujo lateral), así como en los análisis de detección e identificación de OVM basados en ADN.

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

El método de extracción de ADN utilizado fue adecuado pues se desarrolló específicamente para extraerlo en matrices poco procesadas, tales como semillas, por ello al aplicar las respectivas PCR se logró determinar que la integridad y calidad del ADN extraído fue adecuado.

De acuerdo con los principios para la detección y cuantificación de OVM, se logró amplificar de manera adecuada el gen endógeno de referencia asociado con la invertasa de maíz sólo en las muestras que se correspondieron con la especie, de igual forma con el gen de la lectina de soya.

De la aplicación de la estrategia "screening general", se logró la detección del P35S, Tnos y pat en una muestra comercial de maíz, esto dio pie a la detección del evento de transformación DAS-Ø15Ø7-1 asociado con la resistencia a herbicidas y tolerancia a insectos lepidópteros. En cuanto a la detección cualitativa de las secuencias asociadas con el P35S y Tnos, se detectó una (01) muestra de soya que contaba con ambos blancos de detección. Por ello, se procedió identificar, primero *in silico*, y luego en los respectivos ensayos de laboratorio la existencia de semillas OVM que se corresponden con el evento de transformación GTS 40-3-2.

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