

CERTIFICACIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA CONTENIENDO MEZCLAS DE POLVO SECO DE MAÍZ CON DIFERENTES FRACCIONES DE MASA DE MAÍZ MODIFICADO GENÉTICAMENTE MON810

Dr. Hector Nava J. Dr. Yoshito Mitani. Dra. Melina Pérez U.
CENAM

km 4.5 Carretera a los Cués Mpio. del Marqués, Querétaro.
Tel. 442 2110562, Fax. 442 2110569, meperez@cenam.mx, ymitani@cenam.mx, hnavam@cenam.mx

Dr. Ariel Álvarez M. Dra. Sol Ortiz G. Dra. Nathalie Campos R.
Sej. CIBIOGEM

Av. San Borja 938, Colonia Del Valle, México DF 03100
Tel. 5575.6878 Ext. 34. ncampos@conacyt.mx www.cibiogem.gob.mx

Dra. Martha G. Rocha M. Ing. Victor Gutierrez A.
SEMARNAT, INE-CENICA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa. C.P. 09340 Universidad Autónoma
Metropolitana Iztapalapa Edificio de la Ciencia y Tecnología Ambiental "W" 2º piso
Tel. Lab. 5804 6545, Tel. oficinas y fax. 56133821, javedoy@ine.gob.mx, mrocha@ine.gob.mx

*M.en C. Abraham Acatzi S. **Ing. Silvia E. Rojas V.
SAGARPA, SENASICA

* km. 37.5 de la Carretera México-Pachuca, Municipio Tecámac de Felipe Villanueva, Col. Centro, C.P.
55740, Estado de México.

**Guillermo Pérez Valenzuela # 127, Col. del Carmen Coyoacán, Delegación Coyoacán, C.P. 04100. México,
D.F.

Tel. +52 (55) 5905 1000, Ext. 53040, abraham.acatzi@senasica.gob.mx, silvia.rojas@senasica.gob.mx

Resumen: En el presente trabajo se describe la preparación y certificación de materiales de referencia (MRC) de polvo seco de maíz en diferentes fracciones de masa de maíz modificado genéticamente MON810, para utilizarse para la identificación y cuantificación de la existencia de maíz genéticamente modificado. Los MRC se prepararon en 2009 por el CENAM y fueron certificados en el primer trimestre de 2010, bajo la coordinación de la CIBIOGEM y en colaboración con los laboratorios especializados de gobierno federal INE-CENICA y SENASICA-SAGARPA, recibiendo un apoyo económico para este proyecto de la Secretaría de Economía. Los MRC tienen como propósito usarse para la validación de métodos para la detección de alimentos de maíz modificados genéticamente. La concentración de MON810 en los MRC fue verificada usando los métodos de detección de ADN de PCR punto final y PCR tiempo real. Los MRC están disponibles en presentación de frascos de vidrio color ámbar conteniendo 1 g de polvo seco de maíz. El polvo de maíz, sin modificar (*Zea mays*) y el MON810, donados por la compañía Monsanto fueron mayormente molidos, tamizados, secados y homogeneizados previo a la preparación de las mezclas gravimétricas en el CENAM. Los 5 MRC (DMR-436Ia, DMR-436IIa, DMR-436IIIa, DMR-436IVa y DMR-436Va) están en resguardo en el CENAM y en los laboratorios especializados de gobierno federal CENICA y SENASICA.

1. INTRODUCCIÓN

La modificación genética de productos agrícolas se está convirtiendo en un elemento cada vez más importante y motivo de autorizaciones de comercialización de estos productos. En las

autorizaciones de la Unión Europea (UE), por ejemplo, se combinan con la obligación de declarar los alimentos que contienen ingredientes de plantas modificadas genéticamente (Reglamento 1139/98, Reglamento (CE) nº 49/2000). Esto refuerza la necesidad de desarrollar métodos de detección

adecuados, y consecuentemente, la utilización de materiales de referencia certificados (MRC).

Para la implantación de normas nacionales armonizadas con las normas de otras regiones [1-6], que eviten barreras comerciales para los productos nacionales y que salvaguarden la sanidad agropecuaria, el medio ambiente y la salud sin dejar de privarnos de los beneficios potenciales que la biotecnología ofrece, se consideró importante armonizar primeramente a nivel nacional los métodos de detección y cuantificación que emplearían las redes de laboratorios a establecer por cada entidad responsable, para la implantación de la Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados, bajo la coordinación de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM). De esta manera y también bajo la coordinación de la CIBIOGEM se definió un plan de trabajo de los laboratorios especializados en la materia de 4 entidades de gobierno federal: Salud, SEMARNAT, SAGARPA y Economía.

Con el apoyo de la Secretaría de Economía, el CENAM se encargó de la preparación de los candidatos a MR de mezclas de cultivos de maíz genéticamente modificado (OGM) y no modificado, con la finalidad de permitir la validación adecuada de los métodos de tamiz para la detección de la modificación genética de este producto agrícola y alimentos que lo contienen. Se consideró necesario el desarrollo de un conjunto de MRC de polvo de maíz con diferente contenido de modificación genética (evento MON810), además de un blanco ó control negativo y un control positivo, que fueran certificados en colaboración con los laboratorios especializados de gobierno federal CENICA y SENASICA.

2. Desarrollo y Certificación de los Candidatos a MR

2.1 Molienda y secado

El material (granulado de semilla de maíz) recibido, fue molido en un molino de discos oscilantes de ágata y tamizado hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo entre 150 micrómetros y 425 micrómetros, el cual fue determinado por dispersión láser vía húmeda y cuyos resultados para cada material se muestran a continuación en la Tabla 1.

Después de la molienda y tamizado, el material se secó en estufa a 40 °C, hasta obtener una humedad relativa menor ó igual al 3 % en los dos materiales (modificado y no modificado) a mezclar.

2.2 Preparación de las mezclas

Partiendo de polvo de maíz no modificado genéticamente y polvo de maíz modificado MON810, se pesaron las cantidades necesarias para obtener las concentraciones nominales que se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Resultados para el tamaño de partícula utilizando dispersión laser, vía húmeda en los candidatos a MR DMR-436 series Ia-Va.

| MR candidato | | Tamaño de partícula (µm) a un volumen acumulado de: | | |
|--------------|--------|---|--------|--------|
| DMR | Moda | 10 % | 50 % | 90 % |
| 436Ia | 277.22 | 16.95 | 165.71 | 407.14 |
| 436IIa | 416.25 | 16.67 | 174.60 | 477.52 |
| 436IIIa | 280.50 | 15.79 | 169.03 | 403.29 |
| 436IVa | 268.60 | 16.93 | 163.00 | 416.71 |
| 436Va | 241.27 | 18.46 | 144.37 | 353.00 |

Tabla 2. Descripción de los materiales de referencia preparados.

| Nombre | Conc. Fracción masa (g/kg) | Clave del DMR |
|------------------|----------------------------|---------------|
| Control Negativo | | 436Ia |
| Control Positivo | | 436IIa |
| Nivel 1 | 5 | 436IIIa |
| Nivel 2 | 15 | 436IVa |
| Nivel 3 | 110 | 436Va |

Posterior a la preparación, el material fue homogeneizado dentro de una botella en un agitador rotatorio y finalmente envasado en una cámara de guantes en atmósfera de nitrógeno en frascos color ámbar utilizando un microrifler.

2.3 Métodos de medición de OGM

Los métodos de extracción de ADN y métodos de detección por PCR aplicados para la caracterización de los MRC se listan en las tablas 3 y 4 en el orden correspondiente, así mismo se describen a detalle en las referencias 1 a 4 (el protocolo de extracción de Genetic-ID puede consultarse en el sitio <http://www.fastiddna.com/Home.aspx>).

Tabla 3. Métodos de extracción de ADN utilizados para la caracterización.

| | |
|------------|-------------------------|
| Genetic-ID | CENAM, SENASICA, CENICA |
| CTAB | CENICA |

Tabla 4. Métodos de detección por PCR aplicados para la caracterización y/o cuantificación de los MRC.

| |
|--|
| Amplificación por PCR del gen endógeno zeina (Studer et al. 1997) (iniciadores zein3 y zein 4 CENICA) ² |
| Método de tamiz mediante la amplificación del promotor 35S (Lipp et al. 2001) (p35S-cf-3, p35S-cr-4 primer, CENICA) ² |
| PCR tiempo real cebadores y sondas para la amplificación del gen endógeno <i>hmg</i> (high mobility group) |
| PCR tiempo real primers y sondas para la amplificación del promotor p35s ² |
| PCR-tiempo real primers y sondas MON810 ^{1,2} |

¹ Las secuencias de los cebadores y sondas fueron entregadas por Monsanto como información restringida

² En el caso del SENASICA, las sondas utilizadas para identificar el evento MON810, fueron tomadas del JRC- http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/Mon810_validation_report.pdf -, mientras que para la secuencia endógena se utilizó el gen *hmg*.

2.3.1 PCR Punto Final

A continuación se presenta la descripción de la metodología para la caracterización realizada por CENICA utilizando PCR punto final.

El ADN purificado fue evaluado para probar su susceptibilidad de amplificación mediante PCR punto final de un fragmento de 277pb del gen endógeno zeina. La presencia de material genéticamente modificado se verificó mediante la amplificación de un fragmento del promotor p35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) y de un fragmento del terminador nos de la nopalina sintasa (*T-nos*).

La presencia de los productos de amplificación se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

2.4. Estudios de homogeneidad y estabilidad

La homogeneidad se determinó por medición del evento de modificación genética MON810 por PCR tiempo real, así como p35S de acuerdo a los métodos reportados en la sección anterior 2.3. Para la determinación de la homogeneidad se utilizaron los Cts de la amplificación por PCR TR. El modelo utilizado de acuerdo con la NMX-CH-165-IMNC se muestra en la figura 1. Los estudios de homogeneidad se realizaron en el CENAM en dos días diferentes identificados en las tablas de resultados como D1 y D2, para el día 1 y 2

respectivamente, el D 1 se utilizaron 6 muestras ó frascos independientes seleccionados aleatoriamente para cada material candidato, realizándose 3 extracciones de ADN por cada frasco con la finalidad de evaluar la homogeneidad dentro de la muestra y entre muestras, de estas extracciones, se realizaron triplicados para la medición del p35S, MON810 y gen endógeno. Con los resultados de la varianza obtenidos del primer estudio de homogeneidad, se calculó el número de muestras a emplear en el segundo estudio (D2). Los resultados de F obtenidos del ANOVA para cada material y D2 se muestran en la **tabla 5**.

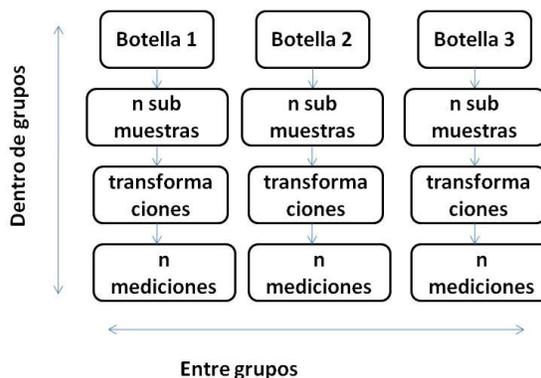


Figura 1. Modelo utilizado para el estudio de homogeneidad

Tabla 5. Resumen de valores de F calculada vs F teórica, D2, para la aceptación o rechazo de homogeneidad en los candidatos a MR.

| Clave del DMR | F calculada | F Tablas | Criterio Se acepta |
|---------------|-------------|----------|--------------------|
| 436IIIa | 1.14 | 1.99 | Sí |
| 436IVa | 1.46 | 2.07 | Sí |
| 436Va | 1.67 | 2.48 | Sí |

Estudios de Estabilidad. Se realizaron monitoreos semestrales a partir de agosto de 2010.

2.5 Certificación

La norma NMX-CH-164-IMNC distingue cuatro enfoques básicos para la caracterización de un material.

- a) medición por un solo método (primario) en un solo laboratorio;
- b) por dos o más métodos de referencia independientes en un laboratorio;

c) medición por una red de laboratorios usando uno o más métodos de exactitud demostrable;
 d) un enfoque método-específico que proporcione solamente valores de las propiedades método-específico, usando una red de laboratorios.
 Para el caso de la certificación de los materiales de referencia motivo del estudio que aquí se presenta, se utilizó la opción del inciso d).

3. RESULTADOS

3.1. En la **tabla 6**. Se muestran los resultados del contenido de proteína total en el maíz 436 la no modificado y 436IIa modificado genéticamente, utilizando el método Kjeldahl.

Tabla 6. Resultados obtenidos para el contenido de proteína en los candidatos a MR DMR 436a series Ia y IIa.

| DMR-436Ia Proteína (%) | DMR-436IIa Proteína (%) |
|------------------------|-------------------------|
| 001 11.36 | 008 11.94 |
| 082 11.40 | 069 11.39 |
| 137 11.49 | 133 11.15 |
| Promedio 11.42 | Promedio 11.49 |
| Desv. Estándar 0.07 | Desv. Estándar 0.40 |
| DER (%) 0.60 | DER (%) 3.50 |

3.2. Resultados PCR Tiempo Real

A continuación se muestra la curva de calibración obtenida por CENAM para la medición del evento específico MON810 (**Fig. 2**) y p35S. Para estas mediciones se usaron como controles los materiales de referencia del IRMM BF 413 f y BF 413c, con concentraciones de masa de 5 % (50 g/kg) y 0.5 % (5 g/kg), para ambos métodos de medición evento específico y del p35S, se encontraron valores dentro del intervalo de incertidumbre reportado en el certificado. Los resultados obtenidos para los controles se muestran en la **tabla 6**. Así mismo en la **Fig. 3** se muestra un gráfico con las concentraciones gravimétricas preparadas vs las concentraciones analíticas encontradas utilizando PCR tiempo real.

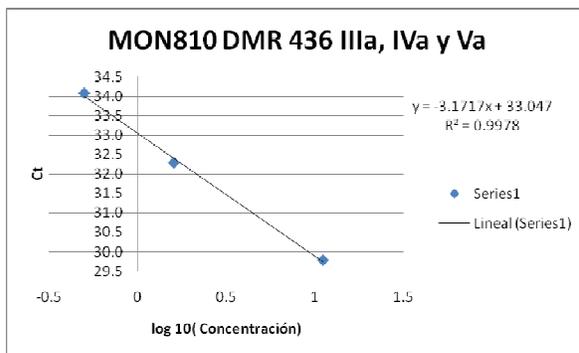


Figura 2. Curva de calibración obtenida con los resultados de Ct para el evento específico MON810 de los candidatos a MR DMR-436IIIa (0.5 %), DMR-436 IVa (1.6 %) y DMR-436 Va (11 %), cada punto es el promedio de 6 frascos con 3 extracciones independientes por frasco, y 3 repeticiones por PCR TR de cada extracción.

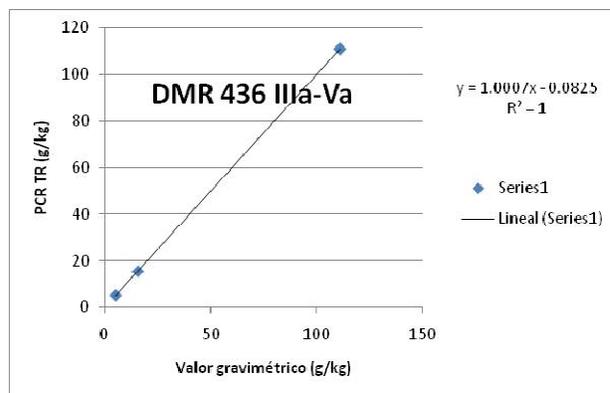


Fig. 3. Gráfico de las concentraciones preparadas gravimétricamente (CENAM) vs las concentraciones analíticas encontradas utilizando PCR tiempo real por SENASICA, CENICA, CENAM, respectivamente.

Tabla 6. Resultados en concentración de masa en g/kg obtenidos para el control ERM-BF 413f MON810

| MRC | Certificada ± U | Interpolada ± U |
|-------------|-----------------|-----------------|
| ERM-BF 413f | 50.0 ± 1.1 | 50.5 ± 3.3 |

Tabla 7. Resultados obtenidos por los laboratorios de referencia sectoriales y utilizados para obtener el valor de referencia certificado e incertidumbre correspondiente.

| Clave del DMR | Nombre | Conc. Nominal (%) | VRC g/kg (k=2) |
|---------------|---------|-------------------|----------------|
| 436IIIa | Nivel 1 | 0.5 | 5.0 ± 1.8 |
| 436IVa | Nivel 2 | 1.5 | 15.4 ± 4 |

4. DISCUSIÓN

De acuerdo a la norma NMX-CH-164-IMNC distingue cuatro enfoques básicos para la caracterización y certificación de un material de referencia.

Para los casos que se presentan en este trabajo se utilizó la opción del inciso d) del punto 2.5, un enfoque método-específico que proporcione solamente valores de las propiedades método-específico, usando una red de laboratorios, en este caso los laboratorios especializados de gobierno federal y nodo central de la red nacional de laboratorios de medición de OGM; CENAM, CENICA y SENASICA.

Actualmente la trazabilidad está en proceso de definición, sin embargo a nivel internacional el único Instituto de metrología que certifica este tipo de materiales biológicos es el IRMM quien reporta en unidades de fracción masa y en porcentaje de número de copias, en este caso particular del maíz se utiliza el peso del genoma del maíz establecido en la bibliografía como 2.725 pg, para lo cual se divide la fracción de masa de ADN obtenida en ng/μL entre el peso del genoma dando como resultado el número de copias.

Como se observa en la Figura 3 existe muy buen acuerdo entre las concentraciones gravimétricas de preparación y las concentraciones analíticas reportadas por los laboratorios del nodo de la red de medición de OGM.

5. CONCLUSIONES

- Los candidatos a MR 436Ia, IIa, IIIa, IVa y Va son homogéneos.
- Se cuenta con aproximadamente 400 muestras incluyendo controles positivo y negativo para realizar un estudio de comparación nacional.
- Se decidió continuar con la certificación del candidato a MR conteniendo el evento NK603, en colaboración con los laboratorios especializados de gobierno federal CENICA y SENASICA, ya que éste contiene al *T-nos*, no contenido en el MON810 y de esta manera completar los estudios de validación, y/o armonización nacional de metodología de medición.

AGRADECIMIENTOS

A la compañía Monsanto por la donación de los candidatos a MR.

A la Secretaría de Economía por el apoyo económico proporcionado para el desarrollo y certificación de los materiales de referencia.

REFERENCIAS

- [1] ISO 24276:2006 Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- General requirements and definitions.
- [2] ISO 21570:2005 Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Quantitative nucleic acid based methods.
- [3] ISO 21571:2005 Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Nucleic acid extraction.
- [4] ISO 21569:2005 Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Qualitative nucleic acid based methods.
- [5] NMX-CH-164-IMNC-2006, Materiales de referencia Requisitos generales para la competencia de productores de referencia. Traducción al español de la ISO Guide 34, General requirements for the competence of reference material producers, 2000.
- [6] NMX-CH-165-IMNC Materiales de Referencia. Principios generales y estadísticos para certificación. Traducción al español de la ISO Guide 35, Reference materials –General and statistical principles for certification, 2006.
- [7] Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. y Anklam, E. "Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs". European Food Research Technology 2121, 497-504, 2001.
- [8] Studer, E., I. Dahinden, J. Luthy, y P. Hübner. Nachweis des gentechnisch veränderten "Maximizer"-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene 88, 515-524. 1997