



Detección del promotor 35S mediante PCR tiempo-real: indicador de transgenicidad en alimentos y *Gossypium* sp.¹

Detection of the 35S promoter by real-time PCR as a transgenic indicator in food and *Gossypium* sp.

Karen Oviedo-Bolaños², Jaime García-González³, Stefany Solano-González⁴, Claudio Martínez-Debat⁵, Carolina Sancho-Blanco², Rodolfo Umaña-Castro²

¹ Recepción: 21 de mayo, 2019. Aceptación: 21 de octubre, 2019. Este trabajo formó parte del proyecto de investigación “Detección molecular de alimentos transgénicos en Costa Rica”. Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Análisis Genómico, Sede Omar Dengo, Heredia, Costa Rica.

² Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Análisis Genómico, Campus Omar Dengo, Heredia, Costa Rica. vane.oviedo21@gmail.com, carolina.sancho.blanco@una.ac.cr, rodolfo.umana.castro@una.ac.cr (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-0041-2788>).

³ Universidad Estatal a Distancia, Área de Agricultura y Ambiente del Centro de Educación Ambiental, y Red de Coordinación en Biodiversidad (RCB), Montes de Oca, Costa Rica. biodiversidadcr@gmail.com

⁴ Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Biológicas, Campus Omar Dengo, Heredia, Costa Rica. stefany.solano.gonzalez@una.ac.cr

⁵ Universidad de la República, Facultad de Ciencias, LaTraMA-Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria, Núcleo Interdisciplinario Colectivo TÁ, Espacio Interdisciplinario, Montevideo, Uruguay. clau@fcien.edu.uy (<https://orcid.org/0000-0003-3015-0117>).

Resumen

Introducción. Los cultivos genéticamente modificados (CGM) son de particular interés, debido al impacto en la economía global. Por lo tanto, como preocupación general, muchos países han establecido regulaciones con respecto a estos organismos. En Costa Rica, el cultivo de OGM se realiza desde 1991; sin embargo, existe un faltante de estudios que monitoreen la ejecución y el cumplimiento de las regulaciones de bioseguridad. **Objetivo.** El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia o ausencia de transgenicidad en alimentos procesados para consumo humano y animal, así como en semillas provenientes de algodón. **Materiales y métodos.** Se utilizó la técnica de PCR tiempo real dirigida a la secuencia promotora 35S, derivada del virus del mosaico de la coliflor (CaMV, siglas en inglés), como marcador para detectar presencia de transgenes en alimentos procesados para consumo humano y animal y en semillas de algodón, silvestre o cultivado, recolectadas en áreas aledañas a una finca de algodón GM en mayo de 2017. **Resultados.** En las muestras analizadas hubo una alta incidencia de fragmentos de 82 pb, correspondientes a la secuencia promotora 35S, que estuvo ausente solo en cultivos de maíz orgánico y sus derivados (tortillas y harina de maíz). Los resultados sugieren la presencia de trazas de OGM en el mercado alimentario costarricense; adicionalmente, revela la urgencia de implementar un adecuado etiquetado para trazabilidad alimentaria. Se identificó, además, la presencia de algodón transgénico en las cercanías de una finca de algodón GM, lo que sugiere la pertinencia de vigilancia en aspectos de bioseguridad y manipulación genética de cultivos. **Conclusiones.** La presencia de trazas de OGM en alimentos procesados muestra la importancia de continuar este monitoreo para proveer elementos de discusión en cuanto a trazabilidad alimentaria y potencial flujo de transgenes en material vegetal silvestre.

Palabras clave: organismos modificados genéticamente, SYBR green, alimentos transgénicos, *Gossypium*, Costa Rica.



Abstract

Introduction. Genetically modified crops (GMC) are of particular interest due to their impact on the global economy. Therefore, as a general concern, many countries have established some regulations in regards to genetically modified organisms (GMOs). In Costa Rica, the cultivation of GMOs has been practiced since 1991; however, there's a lack of studies that monitor the execution and compliance with the biosafety regulations. **Objective.** The objective of the present study was to identify the presence or absence of transgenicidad in processed foods for human and animal consumption, as well as in cotton seeds. **Material and methods.** The real-time PCR technique was used to target the 35S promoter sequence, derived from the cauliflower mosaic virus (CaMV), as a marker to detect the presence of transgenes in processed foods for human and animal consumption as well as in wild or cultivated cotton seeds collected nearby a GM cotton farm in May 2017. **Results.** In the analyzed samples there was a high incidence of an 82 bp fragment, corresponding to the 35S promoter sequence, being absent only in organic corn crops and their derivatives (tortillas, corn powder). Results suggest the presence of GMO traces in the Costa Rican food market, additionally it reveals the urgency of implementing adequate labeling for food traceability. Furthermore, the presence of transgenic cotton in the vicinity of a GM cotton farm was identified, suggesting the relevance of surveillance in aspects of biosafety and genetic manipulation of crops. **Conclusion.** The presence of traces for GMOs in Costa Rican processed food, demonstrates the importance of continuing this monitoring to provide enough elements for a critic discussion about food traceability and potential transgene flow into wild plant material.

Keywords: genetically modified organisms, SYBR green, transgenic food, *Gossypium*, Costa Rica.

Introducción

A nivel global, el área sembrada con cultivos genéticamente modificados (CGM) de canola, maíz, algodón y soya ha presentado un aumento acelerado. Para el año 1996 se registró un total de 1,7 millones de ha, cifra que alcanzó 191,7 millones de ha en 2018. Estados Unidos lidera la producción de CGM, los cuales abarcan actualmente alrededor de 75 millones de ha de la producción global; seguido por Brasil y Argentina (51,3 y 23,9 millones de ha respectivamente). En el 2018 se cultivaron doce CGM en veintiséis países (ISAAA, 2018).

Como consecuencia del incremento global del área dedicada a CGM y sus derivados, los organismos reguladores de distintos países han promovido la necesidad de monitorear su presencia mediante técnicas eficientes a nivel de laboratorio (Pierboni et al., 2016; Eckerstorfer et al., 2019). Aproximadamente sesenta países poseen normativas para el etiquetado de productos que contienen trazas de organismos genéticamente modificados (OGM) que excedan los estándares establecidos por su propia legislación (Leão-Buchir et al., 2018). En Europa se dispuso un valor de 0,9 % de trazas de OGM (Bonfini et al., 2001; Kamle y Ali, 2013; Randhawa et al. 2016; Wei et al., 2018), en Brasil de 1 % (Randhawa et al., 2016); mientras que en Tailandia, Corea y Japón el límite es de 5 % (Randhawa et al., 2016).

En Centroamérica la situación es poco uniforme. En Panamá no existe ninguna regulación para el etiquetado de productos con componentes transgénicos, a pesar de que el 50 % de los alimentos son importados y el maíz, tanto para consumo humano como animal, proviene principalmente de Estados Unidos (Manzur y Cárcamo, 2014; Bravo, 2015), mientras que Honduras aprobó cuatro constructos transgénicos de maíz para su comercialización en el 2012: MON810, Herculex® (Cry35Ab1 DAS-59122-7), YGVTPro® (MON89034), así como un constructo de tolerancia al glifosato (NK603) (De-Jesús-Martínez, 2015).

En Costa Rica durante 2017 se cultivaron variedades GM de algodón (245,5 ha) y soya (0,13 ha), para la producción de semillas certificadas GM para exportación, y piña (15 ha), para investigación. Adicionalmente, en

el pasado se autorizaron áreas pequeñas de experimentación de maíz, banano, arroz y tiquizque GM (Pacheco-Rodríguez y García-González, 2014). A nivel nacional existe la aprobación para la importación y uso de variedades de algodón transgénico como Bollgard® (eventos MON-00531-6, MON-15985-7), Bollgard®/Roundup Ready® (eventos MON-15985-7 x MON-01445-2, MON-15985-7 x MON-88913-8 y MON-00531-6 x MON-01445-2) y Roundup Ready® (eventos MON-01445-2 y MON-88913-8), además, el algodón Widestrike® (eventos DAS-24236-5 x DAS-21023-5), algodón GEM1 (eventos BCS-GH003-6 y BCS-GH004-7) y algodón VIPCOT® (SYN-IR102-7 x SYN-IR67B-1). Recientemente, se avaló el uso del algodón GlyTol® (evento BCS-GH002-5) con resistencia al glifosato (BCH, 2018).

La regulación en Costa Rica no está clara en cuanto a la importación de alimentos de origen o con contenido de ingredientes transgénicos y la trazabilidad alimentaria (García, 2007; Pacheco-Rodríguez y García-González, 2014). Sin embargo, el Reglamento a la Ley de Protección Fitosanitaria N° 26921-MAG, Art. 131, explica que “*para introducir y/o comercializar en Costa Rica productos vegetales u otros organismos modificados genéticamente de uso en la agricultura, deberán ser identificados como tales en una etiqueta en donde el consumidor reconozca las características del producto*”, esto suprime a los alimentos altamente procesados derivados de cultivos genéticamente modificados (Carvajal et al., 2017). A pesar de lo indicado en el artículo del reglamento precitado, los organismos genéticamente modificados de uso en la agricultura no están siendo identificados, tales como maíz y soya. Además, los granos importados procedentes de CGM para el consumo humano y animal pueden mantener su viabilidad y ser utilizados como semillas para ser cultivados (De-Faria, 2005). En un estudio realizado por Carvajal et al. (2017), se reportó por primera vez la presencia de trazas de ADN de maíz y soya GM en granos, piensos y alimentos procesados obtenidos del mercado local costarricense, lo cual evidenció la necesidad de la puesta en marcha de políticas y la toma de decisiones relacionadas con la posibilidad del etiquetado de los alimentos derivados de OGM disponibles en el mercado nacional.

Un aspecto relevante sobre los CGM es la bioseguridad ambiental, por lo tanto, es indispensable la aplicación de regulaciones y medidas adecuadas, así como eficientes para evitar la dispersión de transgenes fuera del área de cultivo permitida (Rostoks et al., 2019). La dispersión no controlada de OGM en el ambiente representa una potencial amenaza para el ecosistema, ya que algunas de estas variedades tienen la capacidad de colonizar de manera descontrolada y convertirse en especies invasoras cuando son liberadas al ambiente (Paull, 2018). Adicionalmente, las modificaciones genéticas que poseen este tipo de variedades transgénicas les confieren una mayor resistencia para competir de manera ventajosa, desplazando a especies silvestres, lo cual puede alterar el balance del ecosistema y la pérdida de biodiversidad nativa (Mathur, 2018). Otro factor importante a tener en consideración es el flujo de genes, ya que es probable que una especie transgénica liberada se hibride con sus parientes silvestres (Conner et al., 2003; Galeano et al., 2010).

En Costa Rica se han encontrado semillas y plantas de algodón en jardines y orillas de caminos, así como motas de algodón en nidos de aves y en lugares cercanos a terrenos autorizados para la siembra de algodón transgénico (Sprenger, 2008). Sin embargo, no existen estudios formales de monitoreo de campo que confirmen que estas semillas y plantas provengan de variedades de algodón GM (García-González, 2010; Pacheco-Rodríguez y García-González, 2014). A nivel nacional, el algodón GM se ha cultivado históricamente para la reproducción de semillas con fines de exportación en las provincias de Guanacaste (Abangares, Bagaces, Cañas y Liberia) y Puntarenas (Chomes y Garabito). Se producen semillas para las corporaciones transnacionales Monsanto, Bayer y Calgene (Pacheco-Rodríguez y García-González, 2014), así como BASF a partir del 2018.

Actualmente, se emplean diversos métodos para detectar trazas de OGM presentes en plantas y alimentos procesados, entre los cuales se encuentran los ensayos basados en proteínas, como el ELISA (Freitas et al., 2016; Yeaman et al., 2016), así como las técnicas enfocadas en la detección cualitativa de ADN transgénico por PCR punto final o cuantitativa por PCR tiempo real (qPCR) (Kamle y Ali, 2013), este último método es considerado como estándar, debido a su elevada especificidad y sensibilidad (Leão-Buchir et al., 2018).

La detección por PCR en tiempo real, tanto cualitativa como cuantitativa, se basa en la identificación de secuencias específicas exógenas, como promotores, terminadores y secuencias codificantes presentes en los eventos transgénicos (Barbau-Piednoir et al., 2010; 2012). Los elementos recombinantes más comúnmente encontrados en los cultivos GM son el promotor 35S (*p*-35S) del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*) y el terminador nopalina sintasa (*t-NOS*); ambas secuencias son reguladoras de la transcripción y forman parte de los constructos de la mayoría de los eventos aprobados para su comercialización internacional, siendo estos indicadores de material vegetal y alimentos procesados que contienen ADN recombinante (Datukishvili et al., 2015; Pierboni et al., 2016; Carvajal et al., 2017; Leão-Buchir et al., 2018).

El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia o ausencia de transgenicidad en alimentos procesados para consumo humano y animal, así como en semillas provenientes de algodón.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Se analizaron veinticuatro muestras de ADN obtenidas por Carvajal et al. (2017) en agosto de 2016 a partir de alimentos sólidos de consumo, tanto humano como animal, con o sin ingredientes de maíz o soya en su fabricación. Los alimentos se obtuvieron de establecimientos comerciales de las provincias de Heredia, Cartago y San José en abril de 2016; además de distribuidores internacionales. También, se analizó una muestra de tortillas tostadas orgánicas producidas en Costa Rica, así como el maíz y la masa utilizada para su manufactura. Adicionalmente, se analizaron semillas provenientes de motas (fibra vegetal) de plantas de algodón (*Gossypium* sp.) colectadas en mayo del 2017, en tres puntos de muestreo cercanos a un cultivo agroindustrial de algodón GM ubicado en el distrito de Chomes, Puntarenas, en suelo o cercano a domicilios residenciales (Figuras 1 y 2).

Extracción y cuantificación del ADN total

El aislamiento y purificación del ADN se realizó en setiembre de 2017, a partir de las semillas de algodón, alimentos procesados B2-5, B2-16, B2-17 y hojas de soya no transgénica (control negativo), según el protocolo Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones (Carvajal et al., 2017). La concentración y pureza del ADN se determinó mediante cuantificación espectrofotométrica a una longitud de 260, 280 y 230 nm (NanoDrop 2000). Para evaluar la integridad del ADN y posible ARN remanente, se visualizó el perfil del ADN total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, TBE (Tris/Borato/EDTA) 0.5X. De 34 muestras de ADN utilizadas en este estudio para la detección molecular de secuencias transgénicas en alimento humano y animal, veinticuatro fueron obtenidas por Carvajal et al. (2017).

Detección de secuencias transgénicas derivadas de OGM por el método SYBR-green PCR tiempo real

Las amplificaciones por PCR tiempo real se realizaron en mayo del 2018, para detectar la presencia de secuencias derivadas de OGM al amplificar una región específica de 82 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*) mediante los cebadores CAMVP 35S-F (5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT-3') y CAMVP 35S-R (5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3') (Van-den-Eede et al., 2011). Como control negativo de amplificación se utilizó una muestra de ADN de una planta de soya certificada como no transgénica, proveniente del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. Para la reacción de PCR tiempo

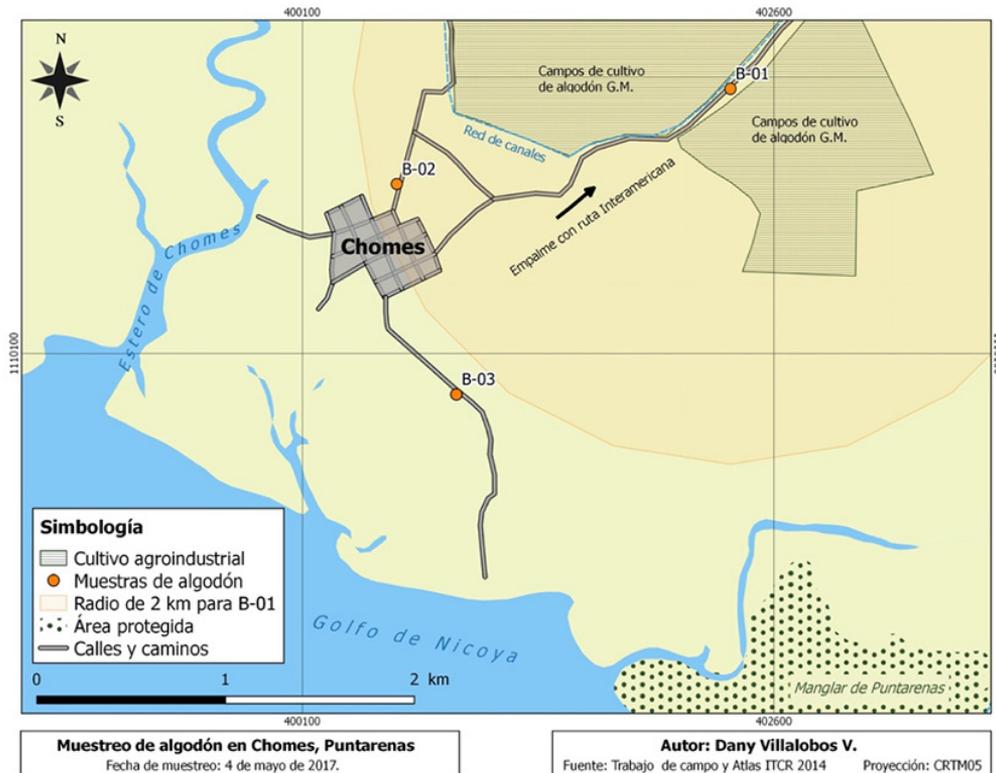


Figura 1. Puntos de muestreo de motas de algodón (*Gossypium* sp.), en el distrito de Chomes, ubicado en la provincia de Puntarenas, Costa Rica. Mayo, 2017.

Figure 1. Sampling points of cotton (*Gossypium* sp.) specks at Chomes district, located in the Puntarenas province, Costa Rica. May, 2017.

real se utilizó el fluoróforo SYBR-green y el kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics). La reacción de PCR se logró con base en las instrucciones del proveedor y se adicionó 0,5 μM de cada cebador y 50 ng de ADN total, para la respectiva reacción enzimática. Las amplificaciones se ejecutaron en un termociclador Light Cyler 96 (Roche) localizado en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica, con el siguiente perfil térmico: 1 ciclo de 4 min a 94 °C para la desnaturalización inicial, seguido por 35 ciclos alternos de 94 °C por 30 s para desnaturalización, alineamiento de cebadores a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C durante 7 min; con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los valores de Ct para cada muestra fueron obtenidos mediante el programa LightCycler® 4,0 (Roche Life Science), considerando como positivas las curvas que superaron el valor umbral recomendado de 0,2 (Takabatake et al., 2015) antes del ciclo 35 (según resultados de cuantificación absoluta) (Barbau-Piednoir et al., 2010; Debode et al., 2017). Una vez finalizada la reacción de amplificación, se realizó el análisis de la temperatura de fusión para determinar la especificidad de los productos de PCR, desnaturalizando estos a 95 °C por 10 s, seguido de 60 s a 65 °C, y finalmente ascendiendo a 97 °C con un rampaje de 4,4 °C s⁻¹.

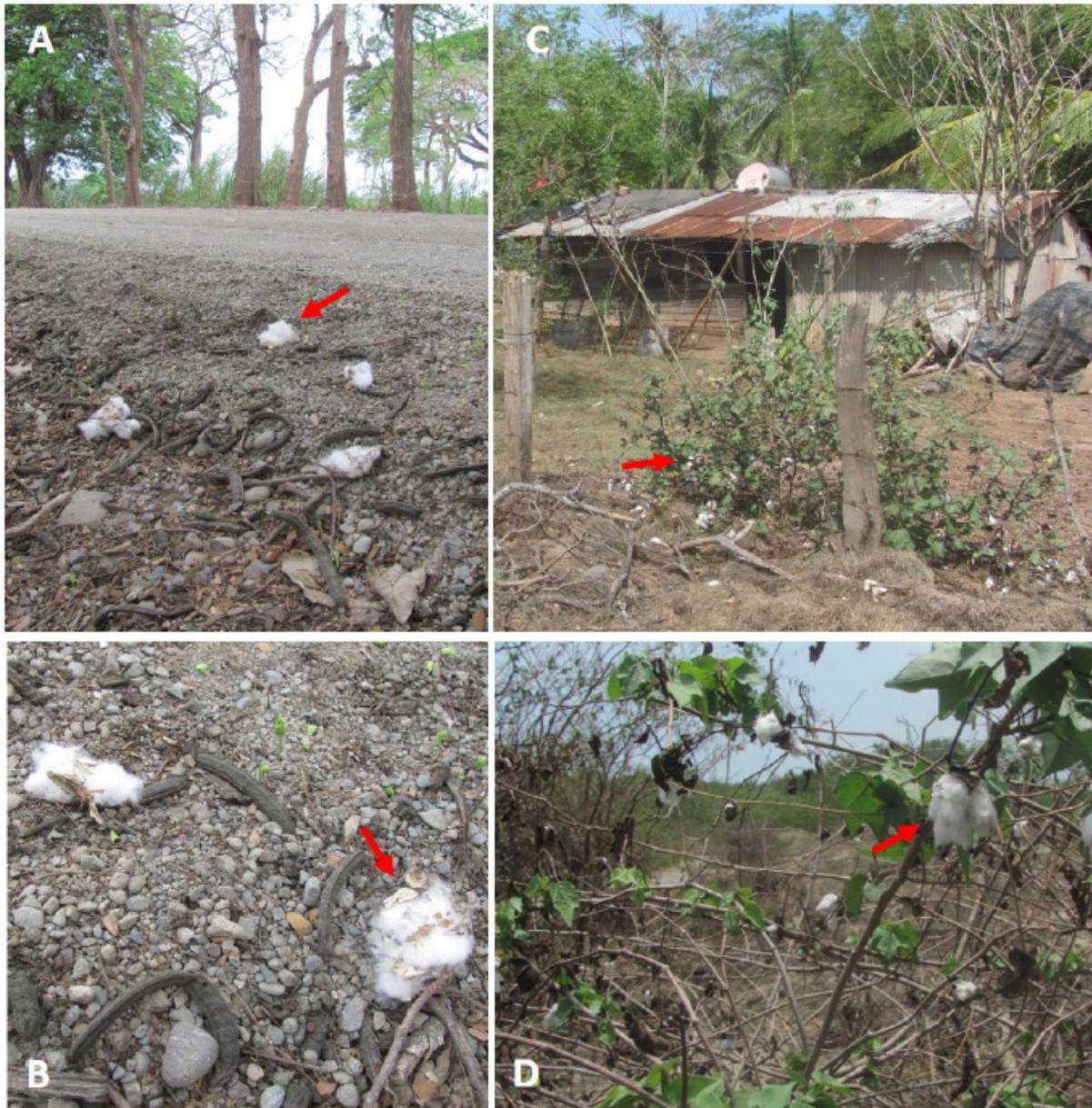


Figura 2. Localidades de colecta de muestras de semillas de algodón (*Gossypium* sp.) obtenidas en el distrito de Chomes, Puntarenas, Costa Rica, Mayo de 2017. A-B) Camino público principal entre campos de cultivo de algodón GM, colecta de muestra B-01. C) Semillas de planta de algodón ubicada al lado de la cerca del jardín de un domicilio particular en la localidad de Chomes, colecta de muestra B-02. D) Semillas de plantas de algodón silvestre (comúnmente denominado por los lugareños como *algodón de montaña*) que colinda con área de manglar, contiguo a camino público que lleva al estero de Chomes, colecta de muestra B-03. Las flechas denotan las motas de algodón colectadas para el análisis PCR en tiempo real con el fin de detectar trazas de secuencias transgénicas.

Figure 2. Locations where cotton seeds (*Gossypium* sp.) samples were obtained in Chomes district, Puntarenas, May of 2017. A-B) Main public road between GM cotton fields, collection point B-01. C) Cotton plant seeds located next to the garden fence of a private home in Chomes, collection point B-02. D) Wild cotton plant seeds (commonly called by the locals as *mountain cotton*) that adjoin the mangrove area, next to a public path leading to Chomes estuary, sample collection B-03. The arrows denote the cotton specks collected for real-time PCR analysis in order to detect traces of transgenic sequences.

Resultados

El valor de concentración del ADN total obtenido de las muestras de semillas de algodón (B-01, B-02 y B-03), tortillas tostadas (B2-5), maíz (B2-16) y harina (B2-17), mostró un intervalo de variación de 46,1 a 915,5 ng μl^{-1} debido a la naturaleza de la matriz analizada. En el perfil de ADN genómico se visualizó material genético íntegro de alto peso molecular, con excepción de las muestras B-03, B2-5 y B2-17, que mostraron ADN parcialmente degradado (datos no mostrados). La detección de trazas de ADN de la secuencia promotora 35S como indicador de transgenicidad se muestran en el Cuadro 1. Se evidencia que, de veintisiete alimentos procesados y evaluados en este estudio, quince resultaron positivos para la presencia del promotor transgénico 35S (59 % de las muestras analizadas), con valores de Ct entre 29,15 y 34,13. Por otro lado, las muestras analizadas de tortillas tostadas orgánicas (B2-5) producidas en Costa Rica, así como el maíz (B2-16) y la harina de maíz (B2-17) utilizadas para manufacturar la muestra B2-5, evidenciaron resultados negativos de amplificación de trazas transgénicas del promotor 35S (Ct >35). Lo anterior sugiere una ausencia preliminar de modificación genética en el maíz orgánico evaluado. En cuanto a las muestras provenientes de las semillas de algodón, se comprobó que dos de las muestras contenían ADN transgénico correspondiente a las muestras de algodón B-01 y B-02, para las cuales se obtuvieron valores de Ct de 21,93 y 26,13, respectivamente. Únicamente la muestra de algodón B-03 mostró ausencia de la secuencia transgénica 35S (Ct >35). Estos resultados sugieren una potencial dispersión de semillas GM (muestras B-01 y B-02) fuera del área restringida para el cultivo de algodón transgénico; lo que refleja un eventual vacío en el sistema de control de dispersión y bioseguridad de OGM.

Las curvas de fluorescencia correspondientes a las muestras consideradas como positivas, tanto para alimentos como para algodón, superaron el valor umbral anterior al ciclo 35. Asimismo, se confirmó la especificidad de los amplicones obtenidos por SYBR Green PCR, mediante la curva de fusión, como referencia se empleó el valor de la temperatura de desnaturalización (T_m) de los picos obtenidos como positivos (84 °C). Para la totalidad de las muestras que resultaron positivas, los valores se encontraron dentro del intervalo 83-84 °C; por lo tanto, se confirmó que los amplicones obtenidos fueron los esperados para el promotor 35S y no fueron amplificaciones inespecíficas. Esta técnica permitió descartar los dímeros de cebadores formados durante la reacción de amplificación, para los cuales se observaron picos de fusión que presentaron una intensidad de fluorescencia inferior a las muestras y valores de T_m entre 66 y 70 °C (Figura 3).

Discusión

La variabilidad en los valores de concentración y la presencia de degradación del material genético tras el aislamiento y purificación del ADN responde a que los alimentos procesados son matrices complejas, tratados con altas temperaturas, daño mecánico y con aditivos presentes (Carvajal et al., 2017); sin embargo, las extracciones de ADN a partir de material vegetal y semillas presentaron una mayor integridad y concentración. En otros estudios se ha reportado la dificultad para obtener material genético de calidad y pureza derivado de alimentos altamente procesados (Fraiture et al., 2015). El método de extracción CTAB con diversas modificaciones ha demostrado ser eficiente para extraer ADN a partir de productos procesados, semillas y material vegetal, dando como resultado elevados rendimientos e integridad de las hebras de ADN.

Al igual que en los análisis por PCR punto final reportados por Carvajal et al. (2017), la amplificación por SYBR Green PCR tiempo real no fue inhibida por la calidad del ADN obtenido, lo que sugiere una óptima extracción y ejecución del ensayo, a pesar de la variabilidad obtenida. Los resultados de este estudio sobre la presencia de transgenicidad en alimentos de consumo humano y animal disponibles en el mercado nacional (59 %), concuerdan con lo reportado por Carvajal et al. (2017). Dicha investigación se basó en la amplificación por

Cuadro 1. Detección por PCR tiempo real de una secuencia específica del promotor 35S derivado de OGM en veintisiete muestras de alimentos de consumo humano y animal, obtenidos de establecimientos comerciales de las provincias de Heredia, Cartago y San José, Costa Rica en agosto de 2016 y en tres plantas de algodón (*Gossypium* sp.) recolectadas en mayo del 2017 en el distrito de Chomes, Puntarenas, Costa Rica.

Table 1. Real-time PCR detection of a specific 35S promoter sequence derived from GMO found in twenty seven human food and animal feed samples, obtained from commercial establishments in the provinces of Heredia, Cartago, and San José, Costa Rica in August 2016 and in three cotton plants (*Gossypium* sp.) collected in May of 2017 in the district of Chomes, Puntarenas, Costa Rica.

Muestra	Código	Origen ^a	Ct ^b	Resultado ^c
Tortillas tostadas de maíz	M-01	ES	29,15	+
Tortillas tostadas de maíz	M-03	CR	>35	-
Nachos con chile jalapeño	M-04	CR	30,45	+
Nachos con queso	M-05	H	30,50	+
Tortillas horneadas de maíz	M-07	CR	30,04	+
Tortillas horneadas de maíz sabor pizza	M-11	CR	30,61	+
Tortillas horneadas de maíz sabor limón y sal	M-12	CR	32,21	+
Bolitas de maíz tostado sabor queso	M-13	CR	>35	-
Anillos sabor pizza	M-17	CR	>35	-
Rosquillas horneadas de maíz	M-22	CR	>35	-
Rosquillas horneadas de maíz	M-23	CR	>35	-
Rosquillas de maíz y queso	M-24	CR	31,72	+
Tortillas de maíz	M-25	CR	29,39	+
Harina de maíz	M-27	CR	31,21	+
Cereal de maíz azucarado	M-30	M	>35	-
Cereal de maíz azucarado	M-33	CR	30,65	+
Cereal de maíz azucarado	M-35	CR	>35	-
Magdalena rellena de dulce de leche	M-41	CR	32,28	+
Salchicha de soya	M-44	CR	>35	-
Salchicha de pavo	M-46	CR	34,13	+
Muslitos de pollo	M-47	CR	33,51	+
Tortas de carne de res	M-49	CR	>35	-
Concentrado (1) para vacas	M-53	CR	33,03	+
Concentrado para aves de postura	M-54	CR	32,64	+
Tortillas tostadas de maíz orgánico	B2-5	CR	>35	-
Maíz orgánico	B2-16	CR	>35	-
Harina de maíz orgánico	B2-17	CR	>35	-
Soya	A2-9	-	>35	-
Planta de soya no transgénica	C-	CR	>35	-
Control negativo1	C ₁ -	-	>35	-
Control negativo2	C ₂ -	-	>35	-
Algodón 1	B-01	CR	21,93	+
Algodón 2	B-02	CR	26,13	+
Algodón 3	B-03	CR	>35	-

^a CR = Costa Rica; ES = El Salvador; H = Honduras; M = México.

^b Se consideraron positivos los valores de ciclo umbral (Ct, *threshold cycle* por sus siglas en inglés) inferiores a 35 (Ct <35) y negativos cuando no se presentó amplificación antes del ciclo 35 (Ct >35) / ^b Values lower than 35 (Ct <35) were defined as a positive result threshold cycle and negative when no amplification was detected at cycle 35 (Ct >35).

^c Los signos + y - representan resultados positivos y negativos, respectivamente / ^c “+” and “-“ represent positive and negative results, respectively.

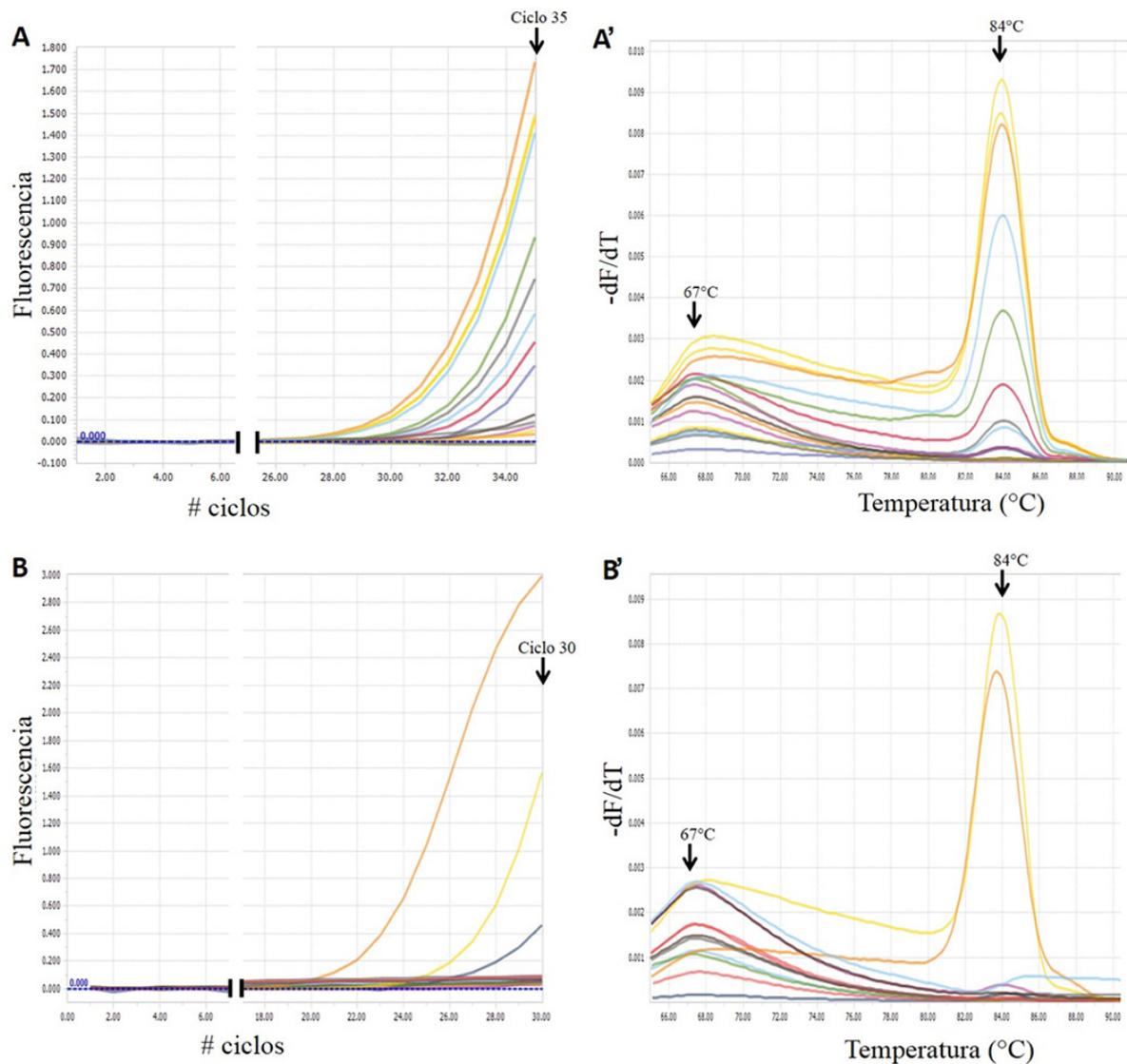


Figura 3. Curvas de amplificación por SYBR®Green PCR tiempo real, mediante los cebadores 35S-F/35S-R para la detección de una secuencia específica del promotor 35S derivado de OGM presentes en alimentos de consumo humano y animal, obtenidos de establecimientos comerciales de las provincias de Heredia, Cartago y San José, Costa Rica en agosto de 2016 y en algodón (*Gossypium* sp.), colectado en mayo del 2017 en el distrito de Chomes, Puntarenas, Costa Rica. A y B) Muestras M-27 hasta M-54 y semillas de algodón (*Gossypium* sp.) muestras B-01, 02 y 03; A' y B') Perfiles de la curva de fusión de los productos de PCR indicando la amplificación específica del producto 35S para muestras de alimentos y de semillas de algodón respectivamente. En el eje Y se indica la inversa de la primera derivada de la curva mejor ajustada de la disminución de fluorescencia (-dF/dT). Las flechas muestran las temperaturas de fusión y el valor Ct usado para discriminar un resultado positivo o negativo de amplificación por PCR tiempo real.

Figure 3. SYBR®Green real-time PCR amplification curves by 35S-F/35S-R primers to detect the specific sequence of the 35S promoter derived from GMO present in food for human and animal consumption, obtained from commercial establishments in the provinces of Heredia, Cartago, and San José, Costa Rica in August 2016, and in cotton plants (*Gossypium* sp.) collected in May of 2017 in the district of Chomes, Puntarenas, Costa Rica. A and B) Samples M-27 through M-54 and cotton seeds (*Gossypium* sp.) samples B-01, 02 and 03. A' and B') Melting curves profiles for PCR products indicating specific amplification of the 35S product for food and cotton seed samples, respectively. Y-axis shows the inverse first derivative for the best-adjustment curve of the fluorescence decay (-dF/dT). Arrows depict the melting point and the Ct value used to discriminate a positive from a negative result of the real-time PCR amplification.

PCR punto final de una secuencia del promotor 35S y del terminador *NOS*. En esta investigación se analizaron 36 alimentos de consumo masivo, el 86 % de estos resultaron positivos para la presencia del promotor 35S, 72 % para el terminador *NOS* y 40 % para eventos específicos de maíz y soya. En Ecuador se realizó un monitoreo con 35 muestras de alimentos procesados, de los cuales 26 (74 %) resultaron positivas para la presencia de *p-35S*, y 8 (23 %) mostraron trazas de la secuencia del *t-NOS* (Coello et al., 2017). Otro estudio realizado en México con muestras (n=370) de alimentos procesados de consumo masivo y derivados del maíz, provenientes de varios países, mostró que el 82 % del total de las muestras analizadas contenía secuencias de ADN transgénico (González-Ortega et al., 2017). El 90 % de las tortillas (el alimento de maíz más consumido en México) analizadas, contenía ingredientes transgénicos y más del 83 % de todas las harinas analizadas contenían maíz transgénico. El 50 % de los cereales de desayuno analizados también contenían transgenes. Estudios similares, empleando la técnica de PCR tiempo real (con tinte fluorescente SYBR®Green) para el monitoreo de trazas de secuencias transgénicas en alimentos, demuestran que esta herramienta es una prueba de referencia con máxima fiabilidad en la detección de secuencias pertenecientes a constructos de OGM, siendo el promotor *CaMV35S* una región blanco evaluada (Barbau-Piednoir et al., 2010; Peng et al., 2016; Yılmaz et al., 2019).

Hubo presencia del constructo genético *pCaMV35S* en dos de las muestras de semillas de algodón colectadas en el distrito de Chomes (muestras B-01 y B-02) en las cercanías de una finca con cultivo de algodón GM. Las muestras de algodón con amplificaciones positivas mostraron valores Ct entre 21-26, en contraposición con la muestra B-03 que no presentó amplificación, debido a que el valor de ciclo umbral (Ct) fue mayor a 35. Similarmente, Peng et al. (2016) indicaron que valores inferiores a Ct = 38 se consideran como positivos para p35S, valor umbral muy cercano al control negativo de este estudio. Por otro lado, Yang et al. (2005) evaluaron mediante técnicas moleculares basadas en PCR, la presencia de constructos genéticos derivados del evento de algodón resistente a insectos Mon531, evento aprobado para uso en Costa Rica (BCH, 2018).

Estos resultados demuestran la presencia de semillas de algodón GM fuera del área restringida autorizada para su cultivo. En el caso de la muestra B-01, es posible que las motas de algodón y sus respectivas semillas provinieran de terrenos contiguos sembrados con algodón GM, en los meses de noviembre o diciembre del 2016. Entre los posibles factores de dispersión que movilizaron las motas de este cultivo hasta el camino público colindante se encuentran las siguientes: i) transporte de semillas desde el terreno de siembra hasta el camino público por efecto del viento; ii) transporte accidental por alguna maquinaria utilizada en las fincas adyacentes al camino público; iii) transporte de las motas de algodón por aves que las utilizan para la construcción de sus nidos fuera del área de siembra de las fincas adyacentes al camino público; y iv) extracción de las motas de algodón por trabajadores y personas de la comunidad de Chomes que las colectaron para la confección de objetos caseros, como almohadas y colchones.

El flujo de transgenes desde un cultivo GM hacia un cultivo silvestre de la misma especie, puede ser mediado por polen, semillas o propágulos vegetales (Lu, 2008). En el caso del algodón, la tasa de polinización cruzada es baja (menor del 10 %), sin embargo, este valor varía dependiendo de las condiciones climáticas y ecológicas propias del lugar. El riesgo de flujo de genes en algodón ocurre principalmente por dispersión de semillas transportadas a través del agua y el viento (Rocha-Munive et al., 2018). Se asume y espera que en las áreas de producción autorizadas haya un estricto control de las normas de bioseguridad durante la siembra, la cosecha y el transporte de las semillas de algodón GM, desde las compañías que las producen en el extranjero hasta los campos de cultivo, y de ahí hasta el lugar donde se procesan las motas que contienen las semillas GM cosechadas; sin embargo, es probable que después de la cosecha las medidas de bioseguridad se flexibilicen, lo que aumenta las posibilidades de propagación de estas semillas al ambiente (Rocha-Munive et al., 2018). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que hubo un movimiento de semillas GM fuera de las áreas autorizadas para su siembra, las cuales representan un posible evento de contaminación de las poblaciones silvestres de algodón con secuencias derivadas de OGM.

Conclusiones

La implementación de la técnica PCR tiempo real mediante la detección del promotor 35S demostró ser una herramienta conveniente de análisis en términos de ejecución y sensibilidad. Hubo evidencia en este trabajo de que en Costa Rica el maíz analizado proveniente de cultivos orgánicos se encuentra libre de una secuencia génica típica presente en alimentos transgénicos, lo cual se traduce en un valor agregado de impacto a nivel comercial. Adicionalmente, se detectó la presencia de transgénicos en dos alimentos de consumo animal. La presencia de contenido transgénico en la mayoría de alimentos procesados para consumo humano demostrada en este estudio, revela la necesidad de un etiquetado en términos de trazabilidad. Las situaciones precitadas fijan interrogantes en torno a la potencial afectación de cultivos nacionales en cuanto a dispersión de transgenes, así como de la implementación de mejores políticas en materia de bioseguridad y el compromiso inherente de dar continuidad a estudios de monitoreo ambiental direccionados a la detección de OGM.

Estos resultados son los primeros monitoreos ambientales de algodón en zonas aledañas a cultivos GM de algodón en Costa Rica. Este estudio sugiere la importancia de dar continuidad a este tipo de investigaciones con el fin de asegurar la adecuada implementación de las medidas de bioseguridad; pues se detectó presencia de transgenes en material vegetal fuera de la zona de siembra permitida. Esto resulta importante cuando existe la posibilidad de movilización por alguno de los cuatro factores de dispersión (por viento, maquinaria, biológica y humana) de material genético hacia sitios protegidos (como el manglar de Puntarenas). Lo apropiado es restringir el contacto directo y asegurar este estado de aislamiento y contención.

Literatura citada

- Barbau-Piednoir, E., A. Lievens, G. Mbongolo-Mbella, N. Roosens, M. Sneyers, A. Leunda-Casi, and M. Van-den-Bulcke. 2010. SYBR®Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *Eur. Food Res. Technol.* 230:383-393. doi:10.1007/s00217-009-1170-5
- Barbau-Piednoir, E., A. Lievens, E. Vandermassen, E.G. Mbongolo-Mbella, A. Leunda-Casi, N. Roosens, M. Sneyers, and M. Van-den-Bulcke. 2012. Four new SYBR®Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready®, LibertyLink®, and Cry1Ab traits in genetically modified products. *Eur. Food Res. Technol.* 234:13-23. doi:10.1007/s00217-011-1605-7
- BCH (Biosafety Clearing-House). 2018. Country profile. Costa Rica. Risk assessment. Conservation on Biological Diversity, BEL. <https://bch.cbd.int/about/countryprofile.shtml?country=cr> (accessed Jan 6, 2018).
- Bonfini, L., P. Heinze, S. Kay, and E.G. Van-den. 2001. Review of GMO detection and quantification techniques. Publications Office of the European Union. EU. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/47b0a030-b501-4a33-ab9a-28baf6eade60/language-en> (accessed Dec. 10, 2018).
- Bravo, E. 2015. Transgénicos en Panamá. GRAIN, WA, USA. <https://www.grain.org/article/entries/5167-transgenicos-en-panama> (consultado Sept 30, 2018).
- Carvajal, P., H. Ureña, J. Umaña, C. Sancho, F. Solano, M. Arleo, C. Martínez-Debat, y R. Umaña. 2017. Detección molecular de secuencias de ADN transgénico en alimentos de consumo humano y animal en Costa Rica. *Agron. Costarricense* 41(1):53-68. doi:10.15517/rac.v41i1.29751
- Coello, R.P., J.P. Justo, A.F. Mendoza, and E.S. Ordoñez. 2017. Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in Ecuadorian manufactured food. *BMC Res. Notes* 10:758. doi:10.1186/s13104-017-3083-x

- Conner, A.J., T.R. Glare, and J.P. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 33:19-46. doi:10.1046/j.0960-7412.2002.001607.x
- Datukishvili, N., T. Kutateladze, I. Gabriadze, K. Bitskinashvili, and B. Vishnepolsky. 2015. New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods. *Front. Microbiol.* 6:757. doi:10.3389/fmicb.2015.00757
- Debode, F., A. Marien, É. Janssen, C. Bragard, and G. Berben. 2017. The influence of amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 21(1):3-11. doi:10.25518/1780-4507.13461
- De-Faria, F. 2005. Granos y semillas transgénicos en cadena alimentaria: Costa Rica. *Ambientico* 137:19-21.
- De-Jesús-Martínez, J. 2015. Evaluación económica del uso de maíz transgénico en el departamento de Olancho, Honduras. Tesis Lic., Zamorano, Francisco Morazan, HND.
- Doyle, J.J., and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Eckerstorfer, MF., M. Engelhard, A. Heissenberger, S. Simon, and H. Teichmann. 2019. Plants developed by new genetic modification techniques-comparison of existing regulatory frameworks in the EU and non-EU countries. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 19:7-26. doi:10.3389/fbioe.2019.00026
- Fraiture, M.A., P. Herman, I. Taverniers, M. De-Loose, D. Deforce, and N.H. Roosens. 2015. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. *BioMed. Res. Int.* 2015:392872. doi:10.1155/2015/392872
- Freitas, M., W. Correr, J. Cancino-Bernardi, M.F. Barroso, C. Delerue-Matos, and V. Zucolotto. 2016. Impedimetric immunosensors for the detection of Cry1Ab protein from genetically modified maize seeds. *Sens. Actuat. B: Chem.* 237:702-709. doi:10.1016/J.SNB.2016.06.149
- Galeano, P., C. Martínez-Debat, F. Ruibal, L. Franco-Fraguas, and G.A. Galván. 2010. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. *Environ. Biosaf. Res.* 9:147-154. doi:10.1051/embr/2011100
- García, J.E. 2007. Cultivos genéticamente modificados: las promesas y las buenas intenciones no bastan. *Rev. Biol. Trop.* 55:347-364. doi:10.15517/RBT.V55I2.6015
- García-González, J. 2010. La contaminación silenciosa. *Biocenosis* 23(1):38-49.
- González-Ortega, E., A. Piñeyro-Nelson, E. Monterrubio-Vázquez, E. Gómez-Hernández, M. Arleo, J. Dávila-Velderrain, C. Martínez-Debat, and E.R. Álvarez-Buylla. 2017. Pervasive presence of transgenes and glyphosate in industrialized maize-derived food in Mexico. *Agroecol. Sustain. Food Syst.* 41:1146-1161. doi:10.1080/21683565.2017.1372841
- ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications). 2018. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2018. Brief N° 54. ISAAA, NY, USA. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/default.asp> (accessed Oct. 15, 2019).
- Kamle, S., and S. Ali. 2013. Genetically modified crops: detection strategies and biosafety issues. *Gene* 522:123-132. doi:10.1016/j.gene.2013.03.107
- Leão-Buchir, J., G.V.M. Pereira, A.L.L. Silva, S. Alban, M.C. Rocha, J. Poletini, V. Thomaz-Soccol, and C.R. Soccol. 2018. Real-time PCR for traceability and quantification of genetically modified seeds in lots of non-transgenic soybean. *Biosci. J.* 34:34-41. doi:10.14393/BJ-v34n1a2018-37236
- Lu, B.R. 2008. Transgene escape from GM crops and potential biosafety consequences: an environmental perspective. *Collect Biosaf. Rev.* 4(4):66-141.
- Manzur, M.I., y M.I. Cárcamo. 2014. América Latina: La transgénesis de un continente. Visión crítica de una expansión descontrolada. 2da ed. Ediciones Boll, Santiago de Chile, CHL.

- Mathur, R. 2018. Genetic engineering and biosafety in the use of genetically modified foods. *IJASRM* 2018(Special I):76-82.
- Pacheco-Rodríguez, F., y J.E. García-González. 2014. Situación de los cultivos transgénicos en Costa Rica. *Act. Acad.* 54:29-60.
- Paull, J. 2018. Genetically modified organism (GMOs) as invasive species. *J. Environ. Protec. Sustain. Dev.* 4(3):31-37.
- Peng, C., P. Wang, X. Xu, X. Wang, W. Wei, X. Chen, and J. Xu. 2016. Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. *SpringerPlus* 5:889. doi:10.1186/s40064-016-2395-y
- Pierboni, E., L. Curcio, G.R. Tovo, M. Torricelli, and C. Rondini. 2016. Evaluation of systems for nopaline synthase terminator in fast and standard real-time PCR to screen genetically modified organisms. *Food Anal. Methods* 9:1009-1019. doi:10.1007/s12161-015-0283-7
- Randhawa, G., M. Singh, and P. Sood. 2016. DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain. *Curr. Sci.* 110:1000-1008. doi:10.18520/cs/v110/i6/1000-1009
- Rocha-Munive, M.G., M. Soberón, S. Castañeda, E. Niaves, E. Scheinvar, L.E. Eguiarte, D. Mota-Sánchez, E. Rosales-Robles, U. Nava-Camberos, J.L. Martínez-Carrillo, C.A. Blanco, A. Bravo, and V. Souza. 2018. Evaluation of the impact of genetically modified cotton after 20 years of cultivation in Mexico. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6:82. doi:10.3389/fbioe.2018.00082
- Rostoks, N., L. Grantiņa-Ieviņa, B. Ieviņa, V. Evelone, O. Valciņa, and I. Aleksejeva. 2019. Genetically modified seeds and plant propagating material in Europe: potential routes of entrance and current status. *Heliyon* 5(2):e01242. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01242.
- Sprenger, U. 2008. La contaminación oculta: semilla transgénica, bioseguridad e intervenciones de la sociedad civil en Costa Rica. AGRECOL e.V., Guggenhausen, DEU. <http://www.agrecol.de/la-contaminación-oculta-semillas-transgénicas-bioseguridad-e-intervenciones-de-la-sociedad-civil-en> (consultado 30 oct. 2018).
- Takabatake, R., M. Onishi, S. Futo, Y. Minegishi, A. Noguchi, K. Nakamura, and K. Kitta. 2015. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control* 50:949-955. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.043
- Van-den-Eede, G., L. Bonfini, L. Cengia, C. Iannini, L. Kluga, and M. Mazzara. 2011. Compendium of reference methods for GMO analyses. Publications Office of the European Union, Luxembourg, LUX. doi:10.2788/16745
- Wei, S., C. Wang, P. Zhu, G. Zhou, W. Fu, and X. Wu. 2018. A high-throughput multiplex tandem PCR assay for the screening of genetically modified maize. *LWT* 87:169-176. doi:10.1016/j.lwt.2017.08.061
- Yang, L., A. Pan, K. Zhang, C. Yin, B. Qian, J. Chen, and D. Zhang. 2005. Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon531. *Transgenic Res.* 14:817-831. doi:10.1007/s11248-005-0010-z
- Yeaman, G.R., S. Paul, I. Nahirna, Y. Wang, A.E. Deffenbaugh, Z.L. Liu, and K.C. Glenn. 2016. Development and validation of a fluorescent multiplexed immunoassay for measurement of transgenic proteins in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Agric. Food Chem.* 64:5117-5127. doi:10.1021/acs.jafc.6b01441
- Yılmaz, R., C. Bayraç, A. Başman, and H. Köksel. 2019. Development of SYBR green-based real time PCR assays for detection and quantification of adulteration in wheat-based composite breads and their in-house validation. *J. Cereal Sci.* 85:91-97. doi:10.1016/j.jcs.2018.11.020