

DETECCIÓN POR PCR DE UN TRANSGEN EN PRODUCTOS DE SOYA UTILIZADOS PARA FORMULAR ALIMENTOS

TRANSGENE DETECTION BY PCR IN SOYBEAN PRODUCTS USED TO PRODUCE FOODS

Javier A. Magaña-Gómez, María A. Islas-Osuna, Gloria Yepiz-Plascencia
y Ana M. Calderón de la Barca^{1*}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Carr. A la Victoria Km 0.6, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Tel. 01 (662) 289-2400 Ext. 288. Fax. 01 (662) 280-0094, Correo electrónico: amc@cascabel.ciad.mx

* Autor responsable

RESUMEN

Las regulaciones internacionales sobre comercialización de organismos transgénicos demandan su detección en los productos alimenticios. En este estudio se probaron tres métodos de extracción de ADN en fuentes de proteína de soya (*Glycine max* L.) usadas como ingrediente en alimentos. Los métodos fueron: A) Homogeneización en SDS 1 %-guanidina-HCl con extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; B) Homogeneización en SDS 1 %-β-mercaptoetanol con precipitación salina; y C) Homogeneización en CTAB y extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. Los tres métodos incluyeron digestión con proteasa de *Streptomyces griseus*. La pureza del ADN extraído se midió por la relación A_{260/280} nm. La calidad se evaluó según su capacidad para amplificar por PCR el gen constitutivo de la β-conglicina y un fragmento del promotor 35S CaMV que identifica como transgénicos a diversos cultivares. Los mejores resultados se obtuvieron con el método CTAB, ya que permitió la extracción y amplificación del ADN incluso en ingredientes de proteína de soya con mayor procesamiento industrial. Además, este método probó ser útil en la detección del transgen en productos alimenticios finales. De las 12 muestras analizadas, siete fueron positivas para el promotor 35S CaMV, cuatro negativas y en sólo una no fue posible la detección de ninguno de los dos genes.

Palabras clave: *Glycine max* L., extracción de ADN, amplificación por PCR, detección, proteína de soya, transgénicos.

SUMMARY

International regulations on trade and marketing of transgenic organisms demand their detection in foodstuffs. In this study, three methods for gDNA isolation were tested in sources of soybean protein derived ingredients in foodstuffs. The methods were: A) Homogenization in 1 % SDS-guanidine-HCl and phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction, B) homogenization in 1 % SDS-β-mercaptoethanol with saline precipitation; and C) Homogenization in CTAB and chloroform:isoamyl alcohol extraction. All methods included digestion with *Streptomyces griseus* protease. The purity of the isolated DNA was measured by the A_{260/280} nm ratio and the quality evaluated by the PCR detection of the β-conglycinine constitutive gene and a fragment of 35S CaMV promoter to identify transgenic crops. The gDNA isolated with the CTAB showed the best results in terms of extraction and amplification of both gene fragments, even in highly processed soybean protein ingredients. Moreover, the CTAB method was useful to detect transgenic material in final foodstuffs. From the 12 analyzed

samples, seven were positive to the 35S promoter and β-conglycinine gene, four negative to the 35S promoter and only in one case none of the genes were detected.

Index words: *Glycine max* L., gDNA isolation, amplification by PCR, detection, soybean protein, transgenics.

INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max* L.) presenta propiedades nutritivas y funcionales muy útiles para la alimentación humana. Debido a la calidad y bajo costo de su proteína, ésta es una de las fuentes más utilizadas como ingrediente en diversos productos alimenticios para el consumo general, así como en fórmulas de alimentación especial. Por su importancia económica, el cultivo de soya se ha modificado genéticamente para mejorar algunas de sus características agronómicas, principalmente la resistencia a herbicidas (Lin *et al.*, 2001).

Las regulaciones sobre etiquetado y comercialización de alimentos transgénicos demandan su detección en diversos productos alimenticios. En los países europeos, Japón y Nueva Zelanda, el etiquetado de productos derivados de organismos genéticamente modificados (OGM), es obligatorio cuando contiene más de 1 % de material modificado (Mitten *et al.*, 1999; Ahmed, 2002). Aunque en México y otros países no hay obligatoriedad de etiquetado de transgénicos, la comercialización internacional exige rastreabilidad de los productos que se importan o exportan. Así, de una u otra forma, se requieren métodos suficientemente sensibles para detectar la presencia de transgenes en ingredientes y productos alimenticios (Kok *et al.*, 2002).

Actualmente existe una variedad de métodos para detección de transgénicos (Lüthy, 1999). Algunos se basan en el estudio de las nuevas proteínas expresadas y pueden ser electroforéticos o inmunoquímicos; otros, en la búsqueda del ácido desoxirribonucleico (ADN) introducido

para la modificación (Ahmed, 2002). Incluso hay juegos de reactivos comerciales para detección de materiales específicos (Trucksess, 2001). Sin embargo, una limitación de las pruebas basadas en proteínas es su desnaturalización debido al tratamiento industrial aplicado al alimento o la especificidad para un sólo tipo de alimento (Ahmed, 2002).

Uno de los métodos más sensibles utilizados actualmente, es la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Ahmed, 2002; Kuiper, 1999). Dicho método permite la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de nucleótidos por medio de iniciadores. En el caso de las plantas transgénicas, se utilizan iniciadores que detecten las secuencias utilizadas para la inserción del transgen en el genoma de la planta. Tal es el caso del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*p35S CaMV*), el terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS), la octopina sintetasa (OCS) y los terminadores CaMV (Stram *et al.*, 2000). También se pueden detectar genes que confieren resistencia a antibióticos, ya que se utilizan como marcadores de selección de la inserción del transgen en el genoma hospedero. Un ejemplo es el gen que confiere resistencia a la kanamicina (neomicina fosfotransferasa) (Kuiper, 1999).

Para permitir la PCR, el ADN debe tener integridad, pureza y concentración adecuadas. El procesamiento del ingrediente o alimento completo a analizar ya sea térmico, con solventes o de otro tipo, afecta la calidad del ADN (Kuiper, 1999; Terry *et al.*, 2002). En la soya se ha aplicado la PCR para detectar cultivares transgénicos, principalmente en el grano crudo, y sólo en un producto cárnico terminado (Lin *et al.*, 2001; Stram *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 1998). No hay estudios de detección en las fuentes de soya utilizadas como ingredientes en alimentos, como harinas, concentrados y aislados, o tratados en otras formas en la formulación de productos terminados.

En este estudio se probaron tres métodos de extracción de ADN genómico (ADNg) y la posibilidad de detección del evento transgénico en ingredientes y alimentos terminados que contienen soya. La integridad del ADNg en los tres tipos de extractos se evaluó por la capacidad de amplificar el gen constitutivo de la β -conglucina subunidad α , como control interno. El fragmento del transgen detectado fue el promotor 35S CaMV del virus del mosaico de la coliflor (*Brassica oleracea* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se analizaron distintas fuentes de soya con diferente tratamiento industrial, algunas utilizadas como ingrediente proteínico para formular productos alimenticios, y otras como productos finales. Las muestras de ingrediente proteínico fueron pasta de soya Gamesa, S.A. (PS); grano de soya crudo RAGASA® (GS) y molido; harina desgrasada de soya NUTRISOY® 7B, con tratamiento térmico ligero; harina desgrasada de soya Bakers NUTRISOY®, con tratamiento térmico moderado; y aislados de soya (AS) SUPRO 500E (de dos lotes, 1995 y 2002) y SUPRO X33, de Protein Technologies International (ahora Dupont). Las muestras de productos alimenticios fueron Protina® (Alimentos, S.A., Guatemala), PROTEMAS® (PMS) (INCAP, Guatemala), galletas de soya Helios (Industrias Helios, Guatemala) y dos fórmulas enterales preparadas en el laboratorio que contenían SUPRO 500E de dos lotes (1995 y 2002, respectivamente). Estas formulaciones contenían 7.44 mg mL⁻¹ de proteína de soya y los demás ingredientes en la proporción recomendada para un producto enteral líquido de uso clínico (WHO, 1999). Cada fórmula fue concentrada cuatro veces por ultrafiltración (Amicon, modelo 8200), en membrana PM10.

Preparación de ADN

Se pesaron 70 mg de muestra pulverizada para probar cada método de extracción de ADNg en los ingredientes proteínicos. El método (A) fue el descrito por Vaithilingom *et al.* (1999), con modificaciones. A cada muestra se le añadieron 890 μ L de buffer TNE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y SDS 1 %), 100 μ L de guanidina HCl 5 M y 10 μ L (20 mg mL⁻¹) de proteasa de *Streptomyces griseus* (Sigma). La mezcla se incubó a 60 °C durante 2 h, con agitación intermitente por inversión y se centrifugó a 10 500 g (12 000 rpm) durante 15 min a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión durante 10 min. Este paso se repitió dos veces. Se tomó el sobrenadante y se mezcló por inversión con 0.6 volúmenes de isopropanol. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo a 7 267 g, 10 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol 70 %.

El método (B), conocido como Dellaporta, fue el descrito por Tozzini *et al.* (2000), con modificaciones. A las muestras se les agregaron 700 μ L de buffer de extracción (Tris HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 1 %) y se incubaron a 65

°C durante 10 min. Posteriormente se les añadieron 10 µL (20 mg mL⁻¹) de proteasa de *S. griseus* y se incubaron 30 min a 65 °C. Terminado este tiempo se les añadieron 200 µL de acetato de potasio 5 M, se colocaron en hielo durante 10 min y centrifugaron a 10 500 g durante 10 min a 4 °C, tres veces, hasta obtener un sobrenadante cristalino. El ADN fue precipitado con un volumen de isopropanol y centrifugado a 290 g durante 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol 70 %.

Al método (C), descrito por Khanuja *et al.* (1999), también se le hicieron modificaciones. La muestra se mezcló con 600 µL de buffer de extracción precalentado a 60 °C (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a 2.5 %, β-mercaptoetanol 0.2 % (v/v) y polivinilpirrolidona (PVP) 1 %; estos dos últimos se añadieron inmediatamente antes de utilizar el buffer. Las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 120 min, en agitación y con mezclado regular por inversión. A los 90 min de iniciado el periodo de incubación se agregaron 10 µL (20 mg mL⁻¹) de proteasa de *S. griseus*. Se centrifugó a 4 650 g durante 10 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10 500 g durante 10 min. Este paso se repitió dos veces. Al sobrenadante se le añadió 0.5 volúmenes de NaCl 5 M y 0.6 volúmenes de isopropanol. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y se centrifugó a 7 267 g durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con etanol 80 %.

La extracción del ADNg de los productos alimenticios y muestras líquidas, se realizó únicamente con el método C. Para los primeros se utilizaron 70 mg de muestra y se agregaron 600 µL de buffer de extracción y 10 µL (20 mg mL⁻¹) de proteasa de *S. griseus*. En el caso de las fórmulas se utilizó 1 mL de cada una y se agregaron 1.5 mL del buffer y 20 µL de proteasa.

Después de los lavados, el etanol fue evaporado al vacío (Speed Vac®, Savant). Las muestras se resuspendieron

en 45 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) a 37 °C. Se les añadieron 5 µL de RNasa A (10 mg mL⁻¹), y se incubaron a 37 °C por 30 min. Los extractos de las muestras en polvo se resuspendieron en 100 µL de buffer TE y los de las muestras líquidas en 50 µL.

La concentración del ADNg se evaluó por espectrofotometría A₂₆₀ nm y la pureza por la relación A_{260/280} nm. Las lecturas se tomaron en un espectrofotómetro Beckman Du® 530.

Detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Los oligonucleótidos iniciadores para PCR fueron diseñados para detectar el gen de la β-conglicina subunidad α y el promotor 35S CaMV (GenBank número de acceso AB051865 y X04879, respectivamente). Los del promotor 35S CaMV fueron publicados por Quist y Chapela (2001). Las secuencias se listan en el Cuadro 1.

Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) en 25 µL de volumen final que contenía 200 ng de ADNg, buffer de PCR con Mg²⁺ 1X (Roche), 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada iniciador, 1 U de DNA polimerasa Taq (Sigma). Los parámetros de PCR fueron: 95 °C por 2 min y 40 ciclos con 95 °C, 45 s; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min y extensión final a 72 °C durante 5 min. En todos los casos se incluyeron controles negativos para confirmar la especificidad de la amplificación, es decir, PCR sin templado y PCR sin oligonucleótidos.

Para la detección se usó electroforesis en gel de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989) con buffer TBE (Tris-borato 0.045 M, EDTA 0.001 M) 0.5X. Para el ADNg se utilizó agarosa a 1 % y se cargaron 15 µL del extracto con 3 µL de buffer de carga 6X. Como marcador se utilizó Lambda DNA/Hind III (Promega). Para los productos de PCR, la agarosa utilizada fue a 2 %, y se cargaron 10 µL del producto de reacción más 2 µL de buffer de carga 6X y, como marcador, PCR 100 bp Low Ladder (Sigma).

Cuadro 1: Oligonucleótidos utilizados en la detección de los genes y sus posiciones en el genoma.

Iniciador	Secuencia	Gen	Posición
35S CaMV (forward)	5'-CACTACAAATGCCATCATTGCGATA-3'	Promotor 35S CaMV	56-275 [†]
35S CaMV (reverse)	5'-CTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCGA-3'		
Congli (forward)	5'-GATTGAAAACCTGAAGGTCGC-3'	β-conglicina subunidad α	2643-2844 ^{††}
Congli (reverse)	5'-CCCTCAAAATTGAAGACAAAGG-3'		

[†] 35S CaMV Número de Acceso del GenBank X04879.

^{††} β-conglicina subunidad α, Número de Acceso del GenBank AB051865.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad del ADNg

El ADNg obtenido por cada uno de los métodos varió según el tipo de muestra probada. El método C que emplea el detergente CTAB, produjo un ADN genómico de mejor calidad, con valores de relación de absorbancias 260/280 nm entre 1.59 y 1.969. En el gel de agarosa de la Figura 1, se observa el ADNg extraído de algunas de las muestras con los tres métodos. El método C presentó la mejor opción para la mayoría de las muestras, excepto para la pasta de soya, la cual sólo se visualizó en el extracto obtenido por el método B. Sin embargo, los extractos de este último método contenían impurezas y alta concentración de sales, lo que interfirió en la migración del material genético ya que presentó movilidad retrasada (Figura 1). Tales impurezas podrían también interferir en el análisis por PCR. Por el contrario, el método C mostró bandas mejor definidas de alto peso molecular.

Detección de transgenes en muestras procesadas

El proceso de extracción de ADNg afecta la integridad del material genético y ocasiona rompimiento de las cadenas (Sambrook *et al.*, 1989). Este efecto es aún más intenso en muestras que han sido sometidas a diversos procesamiento. Para probar la calidad del ADNg, se amplificó por PCR un fragmento del gen constitutivo de la soya, la β -conglucina subunidad α . La Figura 2A presenta los productos de PCR, analizados por electroforesis, de los tres tipos de extractos, correspondientes a cinco de las muestras. Con el método C, además de obtener mejor calidad del ADNg como ya se comentó, la amplificación del gen constitutivo fue muy buena para las muestras GS RAGASA®, NUTRISOY® 7B y Bakers NUTRISOY®. Como se observa, el ADNg extraído de esta última por los métodos A y B, no pudo ser amplificado, quizás debido al tra-

tamiento térmico al que se somete durante su elaboración, el cual es más intenso que el de las otras dos muestras. Esto tal vez podría haber inducido interacciones de la proteína con el material genético, que requiere la presencia de detergente en la extracción para liberar el ADN.

Por el contrario, la amplificación del gen constitutivo de la pasta de soya sólo fue posible con el material extraído por los métodos A y B (Figura 2A). Para AS Supro 500E del lote de 1995, sólo con el material del método B se dio la amplificación. Sin embargo, al realizar la detección del gen del promotor 35S CaMV, indicativo de la transformación en pasta de soya, éste resultó positivo con el ADNg extraído por cualquiera de los tres métodos (Figura 2B). Lo mismo sucedió al amplificar este promotor a partir del material extraído de GS RAGASA® y NUTRISOY® 7B, con cualquiera de los tres métodos. La única diferencia fue que las bandas del amplicón del método B resultaron menos intensas respecto a las otras dos. Las muestras Bakers NUTRISOY® y AS Supro 500E del lote de 1995, resultaron negativas para este promotor (Figura 2B).

Así, el método de extracción C que incluye CTAB, fue el más efectivo para la extracción de ADNg. Con el material extraído por este método fue posible la amplificación del gen constitutivo tanto en muestras sin gran proceso industrial como GS RAGASA®, así como en las de mayor proceso como Bakers NUTRISOY®. Por esto se procedió a aplicarlo en los demás productos muestreados.

Dado que la amplificación del gen de la β -conglucina subunidad α se utilizó como control interno para verificar la calidad del ADN extraído, se esperaba que en todos los casos resultara positiva. La Figura 3 muestra que así fue, excepto para la galleta Helios®. Esto se debió probablemente a su bajo contenido de soya en el producto final, ya que sólo contiene 1.6 % de la fuente proteica de soya.

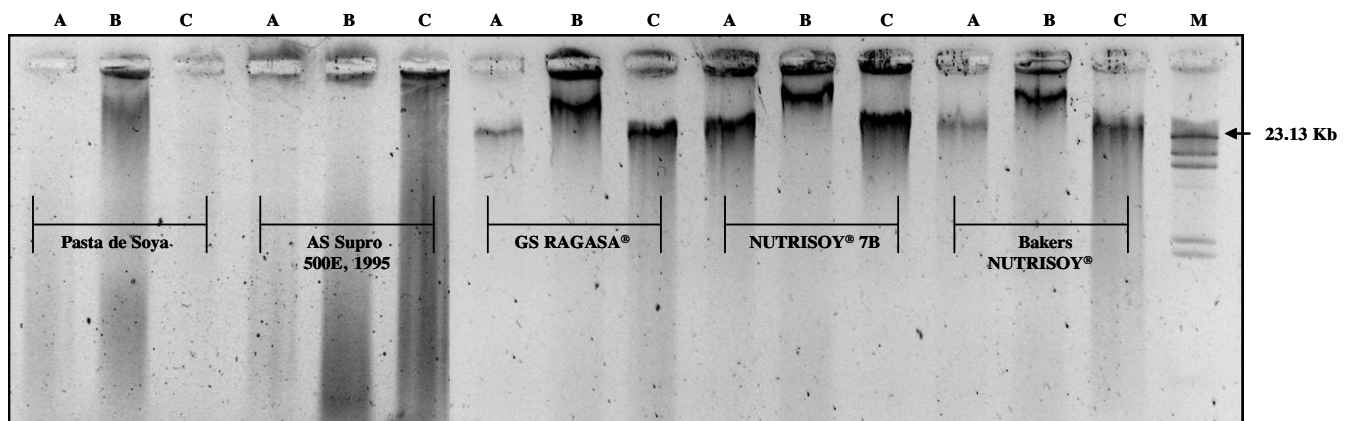


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa del ADNg de ingredientes proteicos de soya, extraído por tres métodos diferentes: A= guanidina HCl, fenol:clorormo:alcohol isoamílico (25:24:1), B= SDS + β -mercaptoetanol y C= CTAB. Marcador de peso molecular λ /Hind III (M).

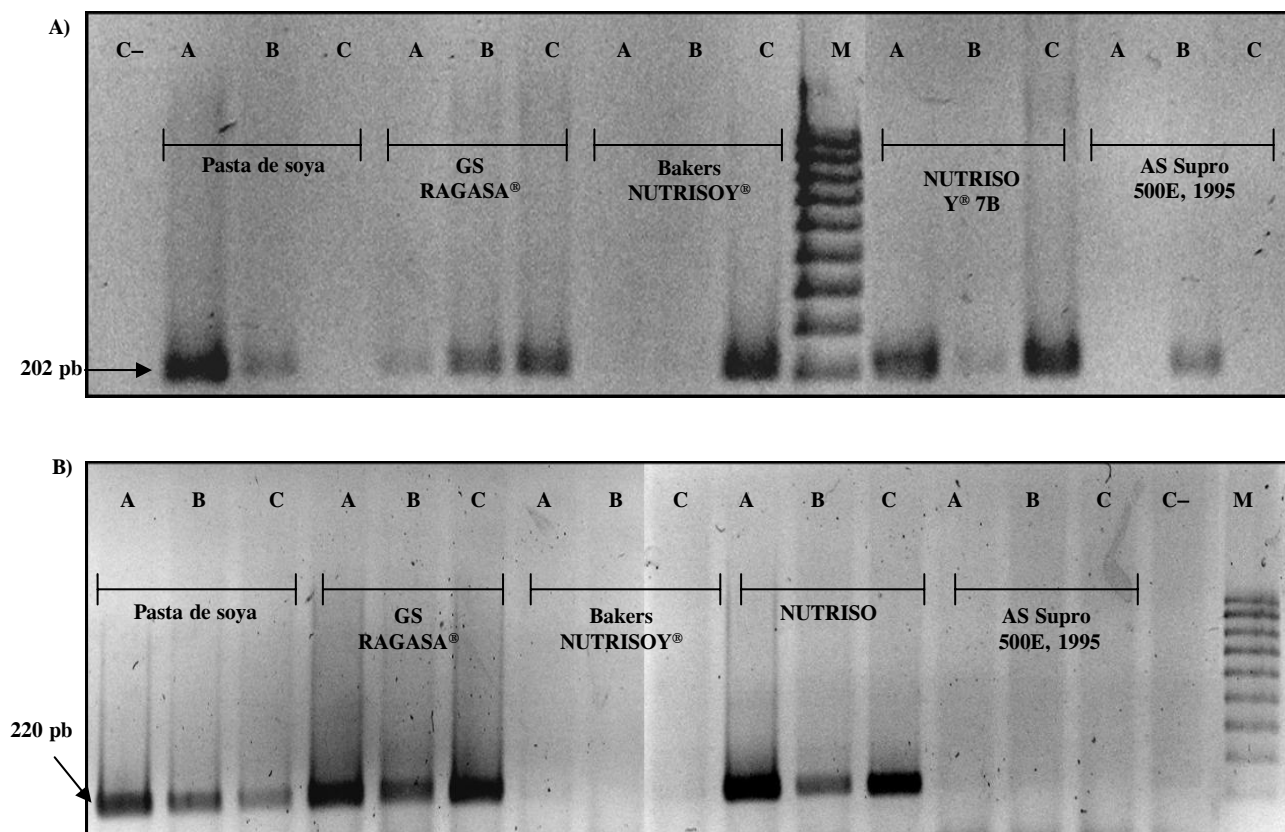


Figura 2. Productos de la amplificación por PCR del gen de la β -conglucina subunidad α [A] y del promotor 35S [B] en extractos obtenidos por los tres métodos (A, B y C). Control negativo (C-); Marcador PCR 100 pb Low Ladder (M).

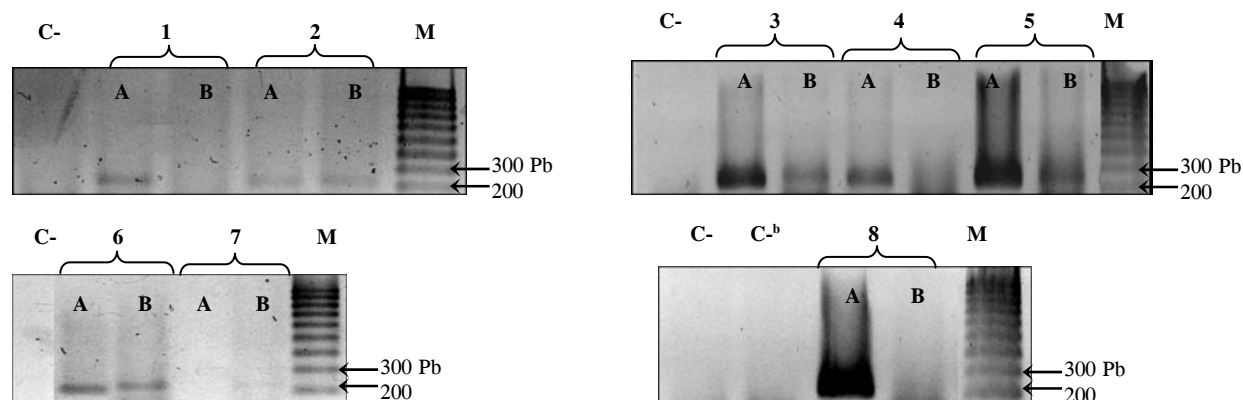


Figura 3. Amplificación del gen de la β -conglucina subunidad α (A) y del promotor 35S (B) en fuentes proteicas de soya y productos alimenticios de soya. 1= AS SUPRO 500E lote 1995; 2= PROTEMAS; 3= AS SUPRO 500E lote 2002; 4= AS SUPRO X33; 5= fórmula líquida con AS SUPRO 500E lote 2002; 6= PROTINA; 7= galleta HELIOS; 8= fórmula líquida con AS SUPRO 500E lote 1995. Control negativo sin ADN para p-35S (C-); control negativo para β -conglucina subunidad α sin ADN (C^{-b}); Marcador PCR 100 pb Low Ladder (M).

En cuanto al promotor 35S CaMV, siete de las muestras analizadas fueron positivas (Figura 3), lo cual sugiere que se trata de productos transgénicos. Dichas muestras fueron el grano de soya RAGASA®, harina desgrasada de soya NUTRISOY® 7B, pasta de soya de Gamesa, S.A., AS SUPRO 500 E del lote 2002, la fórmula enteral preparada con aislado de soya de este mismo lote, PROTE-

MAS® y PROTINA®. En términos netos, la detección en las muestras líquidas se hizo a partir de 33 mg de aislado de soya, casi la mitad de la cantidad que contienen las muestras en polvo. El resto de las muestras, resultaron negativas al promotor 35S CaMV por lo que se trata de muestras no transgénicas.

En todos los casos se incluyeron controles negativos en las reacciones de PCR que contenían agua en lugar del ADN_g, y de forma independiente, al omitir los oligonucleótidos en la reacción y repetir los análisis por lo menos tres veces para cada muestra. La identidad de los productos amplificados por PCR fue corroborada por la determinación directa de la secuencia nucleotídica de ambas cadenas en cuatro muestras. La secuencia fue prácticamente idéntica a la publicada para el CaMVG2 (número de acceso en GenBank V00141), desde la posición 7217 a 7386, una vez que se removieron las secuencias de los oligonucleótidos. El fragmento fue de idéntica longitud y sólo en los casos de GS y PMS se encontró una base diferente, lo que confirma la presencia del transgen en los productos hechos con soya.

En un ensayo preliminar, el método conocido como Dellaporta (Tozzini *et al.*, 2000) fue útil en maíz (*Zea mays* L.) (datos no mostrados), pero con fuentes de soya no fue consistente. El problema principal fue su elevada concentración de proteína, que en el caso de los aislados es de más de 90 %; así que se probaron otros métodos, para muestras con gran cantidad de proteínas y otros metabolitos. Stram *et al.* (2000) detectaron ADN recombinante (ADN_{rec}) en el empanizado de un producto cárnico; para confirmar sus resultados realizaron la detección en harina de orígenes diferentes. Vařtilingom *et al.* (1999) también detectaron ADN_{rec} por PCR en harinas de soya. En ambos estudios (Stram *et al.*, 2000; Vařtilingom *et al.*, 1999) se usó un juego comercial de reactivos para purificación de ADN previo a la detección y esto encarece el método.

El detergente CTAB se ha utilizado para aislar ADN_g de muestras frescas y secas con grandes cantidades de carbohidratos, metabolitos secundarios y grasas (Khanuja *et al.*, 1999), y por eso se incluyó en el presente estudio. Al ensayarlo en fuentes de proteína de soya y productos que las contienen, produjo un ADN_g con calidad para PCR. Otra de las ventajas sobre otros métodos fue la ausencia de fenol en el proceso, que lo hace menos peligroso. Tampoco se utilizó un juego de reactivos comerciales para la purificación previa del ADN, por lo que es menos costoso. La adición de la proteasa de *S. griseus*, junto con el uso de PVP y β -mercaptoetanol, favoreció la eliminación de metabolitos secundarios de la planta que pueden inhibir la PCR.

Los pasos posteriores de detección por PCR también fueron útiles, ya que se logró la amplificación del transgen, inclusive en la muestra de mayor procesamiento industrial en donde el ADN está totalmente degradado. Lo anterior fue posible por el tamaño pequeño seleccionado del amplicón (202 pb para β -conglucina y 220 pb para p35S CaMV), que es menor al tamaño mínimo recomen-

dado por Kuiper (1999) del ADN_g (aproximadamente de 400 pb) para ser amplificado por PCR.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que la metodología desarrollada para la detección, incluyendo la PCR para verificar la integridad del ADN y la de detección del transgen, fue efectiva. Esta secuencia de pasos es aplicable para detectar transgenes que contengan el promotor 35S CaMV en toda fuente de proteína de soya que sea utilizada como ingrediente, así como en productos alimenticios terminados. Así mismo, es importante amplificar un gen constitutivo del material como control interno de la reacción. Además, es una ventaja extraer por medio del mismo tratamiento, al material genético de muestras de diversa naturaleza, ya que así se podrá an trabajar mayor cantidad de muestras al mismo tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al MC Adolfo Ruiz por proporcionar las muestras de trabajo y a la MC Alma Peregrino Uriarte por su apoyo técnico. Al CONACYT (Programa Consolidación Institucional: Investigadores Mexicanos) el apoyo brindado a María A. Islas-Osuna y la beca de maestría de Javier A. Magaña, ambos autores de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed F E (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. Trends Biotechnol. 20:215-223.
- Khanuja S P S, A K Shasany, M P Darokar, S Kumar (1999) Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Mol. Biol. Rep. 17:1-7.
- Kok E J, H J M Aarts, A M A Van Hoef, H A Kuiper (2002) DNA methods: critical review of innovative approaches. J. AOAC Int. 85:797-800.
- Kuiper H A (1999) Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organism. Food Control 10:339-349.
- Lin H Y, J W Chiang, D Y C Shih (2001) Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits. J. Food Drug Anal. 9:160-166.
- Lüthy J (1999) Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. Food Control 10:359-361.
- Mitten D, R MacDonald, D Klonus (1999) Regulation of foods derived from genetically engineered crops. Curr. Opin. Biotechnol. 10:298-302.
- Quist D, I H Chapela (2001) Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Nature 414:541-543.
- Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp:6.2-6.3.
- Shirai N, K Momma, S Ozawa, W Hashimoto, M Kito, S Utsumi, K Murata (1998) Safety assessment of genetically engineered food: detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:1461-1464.

- Stram Y, A Vilks, I Klinger (2000)** Detection of residues of genetically modified soybeans in breaded fried turkey cutlets. *J. Food Sci.* 65:604-606.
- Terry C F, N Harris, H C Parkes (2002)** Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *J. AOAC Int.* 85:768-774.
- Tozzini A C, M C Martínez, M F Lucca (2000)** Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electron. J. Biotechnol.* 3:1-5.
- Trucksess M W (2001)** Determination of Cry9C protein in corn-based foods by enzyme-linked immunosorbent assay: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 84:1891-1901.
- Vařilingom M, H Pijenburg, F Gendre, P Brignon (1999)** Real-Time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.* 47:5261-5266.
- WHO (1999)** Management of Severe Malnutrition: a Manual for Physicians and Other Senior Health Workers. World Health Organization. Geneva. pp: 1-68.